

Untersuchungen zur stabilitätsspezifischen Analytik,
chemischen und physikalischen Stabilität von
Konservierungsmitteln in wässrigen Ophthalmika

Otto Ernst Schubert

UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄTSSPEZIFISCHEN ANALYTIK,
CHEMISCHEN UND PHYSIKALISCHEN STABILITÄT VON
KONSERVIERUNGSMITTELN IN WÄSSRIGEN OPHTHALMIKA

DISSERTATION
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
OTTO ERNST SCHUBERT
aus München

München 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Thoma
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reimann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.86

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Thoma am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater
Herrn Prof. Dr. K. Thoma

danke ich herzlich für die Auswahl des Themas, seine wissenschaftliche Anleitung sowie für die vielfältige Förderung und jederzeit großzügig gewährte Unterstützung meiner Untersuchungen.

Fräulein I. Hiltmann danke ich für die sorgfältige Mitarbeit bei der Viskositätsmessung von Ophthalmika und der Probenvorbereitung für hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>E i n f ü h r u n g</u>	11
B. <u>E r g e b n i s s e d e r U n t e r -</u> <u>s u c h u n g e n</u>	
I. Entwicklung von hochdruckflüssigkeitschromato- graphischen Analysenmethoden zur stabilitäts- spezifischen Analytik von Konservierungsmitteln in Augentropfen	15
1. Bestimmung alkoholischer Konser- vierungsmittel	16
2. Bestimmung von Chlorhexidindiacetat und Chlorhexidindiglukonat	21
3. Bestimmung von quartären Ammonium- verbindungen	25
4. Bestimmung von Organoquecksilber- verbindungen	33
5. Möglichkeiten und Probleme der prak- tischen Anwendung	38
II. Entwicklung einer mikrobiologischen Methode zum quantitativen Nachweis von Konservierungs- mitteln in Augentropfen	40
1. Überprüfung der Eignung des Agardiffu- sionstests für Konservierungsmittel in Augentropfen	40
2. Einflüsse auf den Agardiffusionstest für Konservierungsmittel in Augentropfen .	43
2.1 Einfluß des pH-Wertes	43
2.2 Einfluß von Wirk- und Hilfsstoffen	47
3. Überprüfung von Konservierungsmittel- gehalten in Fertigarzneimitteln mit Hilfe des Agardiffusionstests	50
4. Diskussion	55

III.	Beeinflussung der Stabilität und Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln durch die Herstellung von Augentropfen	56
1.	Einfluß von Filtrationsmenge und Filtermaterial auf die Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln bei der Entkeimungsfiltration	57
1.1	Diskussion und Schlußfolgerung	61
2.	Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch Hitzesterilisation .	63
2.1	Diskussion und Schlußfolgerung	66
3.	Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch Augentropfenbehälternisse und Tropfaufsätze	68
3.1	Diskussion und Schlußfolgerung	76
4.	Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch isotonisierende Zusätze	79
4.1	Beeinflussung der Stabilität von Chlorhexidinsalzen durch isotonisierende Hilfsstoffe	79
4.1.1	Diskussion und Schlußfolgerung	85
4.2	Beeinflussung der Stabilität von Thiomersal durch isotonisierende Zusätze . . .	89
4.2.1	Diskussion und Schlußfolgerung	92
IV.	Stabilität und Dosierungsgenauigkeit von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei der Herstellung von Augentropfen	94
1.	Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen	94
1.1	Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei Lagerung in Glasflaschen	96
1.2	Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei Lagerung in Polyethylenflaschen	99

	Seite
2. Dosierungsgenauigkeit von Konservierungs- mittel-Stammlösungen	105
3. Diskussion	108
V. Untersuchungen zur Frage der Haltbarkeit von Augentropfen während der Anwendung	111
1. Stabilität von Adrenalin-Präparaten wäh- rend der Anwendung	113
2. Stabilität von Konservierungsmitteln während der Anwendung	119
2.1 Verluste an Konservierungsmittel bei Anwendung von wirkstofffreien Lösungen . .	120
2.2 Verluste an Konservierungsmittel bei Anwendung von Fertigarzneimitteln	129
3. Diskussion	133
VI. Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität von flüssigen Ophthalmika-Fertigarzneimitteln . .	137
1. Arzneiformen und Wirkstoffe bei Ophthal- mika-Fertigarzneimitteln	137
2. Untersuchung wäßriger Augentropfen- Fertigarzneimittel	139
2.1 Sterilität	139
2.2 Konservierungsmittel	140
2.3 Tonizität	141
2.4 pH-Wert	143
2.5 Viskosität	145
2.6 Augentropfenbehältnisse	147
2.7 Verfalldatum und Haltbarkeitsdauer	147
3. Untersuchungen von Augenwässer-Fertig- arzneimitteln	148
3.1 Wirkstoffe	149
3.2 Pharmazeutische Qualität von Augenwässern	149
4. Untersuchung homöopathischer Augen- tropfen-Fertigarzneimittel	151
4.1 Konservierungsmittel	151

	Seite
4.2 Tonizität	152
4.3 pH-Werte	153
5. Untersuchung öliger Augentropfen	154
6. Diskussion	155
 C. <u>Experimenteller Teil</u>	
I. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungen	158
1. Geräte und Materialien	158
2. Durchführung der Bestimmungen	161
2.1 Stabilitätsspezifische Bestimmung von alkoholischen Konservierungsmitteln	162
2.2 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Guanidin-Konservierungsmitteln	162
2.3 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Konservierungsmitteln vom Typ quartäres Ammoniumsalz	162
2.4 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Konservierungsmitteln vom Typ Organo- quecksilberverbindung	162
3. Errechnung von Kapazitätsfaktoren, rela- tiver Retention und Auflösung	163
 II. Entwicklung einer mikrobiologischen Methode zur Analytik von Konservierungsmitteln in Augen- tropfen	164
1. Agardiffusionstest	164
2. Einflußfaktoren auf den Agardiffusions- test von Konservierungsmitteln	166
3. Einfluß des pH-Wertes	169
4. Einfluß von Wirk- und Hilfsstoffen	170
 III. Beeinflussung der Stabilität und Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln durch die Herstellung von Augentropfen	173

	Seite
1. Beeinflussung durch die Entkeimungs- filtration	173
2. Beeinflussung durch die Hitzesterilisation	173
3. Beeinflussung durch verschiedene Pack- mittel	175
4. Beeinflussung durch isotonisierende Zu- sätze	176
4.1 Durchführung der Versuche	176
4.2 Infrarotspektroskopische Untersuchungen .	178
4.3 Dünnschichtchromatographische Messungen .	178
 IV. Stabilität und Dosierungsgenauigkeit von Kon- servierungsmittel-Stammlösungen bei der Her- stellung von Augentropfen	 179
1. Durchführung der Stabilitätsversuche . . .	179
1.1 Stabilität von Benzalkoniumchlorid- und Phenylquecksilberborat-Stammlösungen in Glasflaschen	179
2. Dosierungsgenauigkeit von Konservie- rungsmittel-Stammlösungen	180
2.1 Bestimmung des Tropfgewichts	181
2.2 Bestimmung des Gehalts von Konservie- rungsmittel nach Tropfdosierung	181
 V. Untersuchungen zur Frage der Haltbarkeit von Augentropfen während der Anwendung	 182
1. Stabilität von Adrenalin-Präparaten während der Anwendung	182
2. Stabilität von Konservierungsmitteln während der Anwendung	186
 VI. Untersuchungen zur pharmazeutisch-technologi- schen Qualität von flüssigen Ophthalmika- Fertigarzneimitteln	 187
1. Bestimmung der Tonizität	187
2. Bestimmung des pH-Wertes	187

	Seite
3. Bestimmung der Viskosität	187
4. Überprüfung der Sterilität	188
5. Untersuchung öligcr Augentropfen	190
D. <u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	191
E. <u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	196

A. E i n f ü h r u n g

Ophthalmika, insbesondere wäßrige Augenarzneimittel, zählen zu den Darreichungsformen, deren pharmazeutische Qualität von besonderem Interesse ist. Bestimmend dafür sind vor allem die verschärften Anforderungen der Arzneibücher an diese Darreichungsformen:

Augenarzneimittel sind insbesondere von den sich weltweit seit den 60er Jahren vollziehenden Veränderungen der mikrobiologischen Reinheitsanforderungen betroffen worden. Verschiedene Maßnahmen zur Verbesserung ihrer Arzneimittelsicherheit gingen in die ihre Herstellung regelnden Arzneibuch-Monographien und Zulassungsrichtlinien ein. Die rasche Entwicklung der instrumentellen, stabilitätsspezifischen Arzneimittelanalytik und die für Augenarzneimittel typische Anwendung hochwirksamer, in wäßrigen Arzneizubereitungen besonders instabiler Arzneistoffe, führte zu steigenden Anforderungen an die Stabilität wäßriger Augentropfen.

Im DAB 8 wurden 1978 erstmals für die Bundesrepublik Deutschland Rechtsnormen für die Herstellung von Augentropfen geschaffen, wobei in der pharmazeutischen Praxis vielfach nicht ausreichende praktische Erfahrungen vorlagen.

Besonders deutlich zeigt sich dies bei der für wäßrige Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen vom Arzneibuch vorgeschriebenen Konservierung und der ebenfalls geforderten 4wöchigen Aufbewahrungsfrist nach Anbruch.

Gerade die einwandfreie Anwendung der Konservierungsmittel ist im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätsanforderungen durch besondere Umstände erschwert:

- Das Spektrum der anwendungsfähigen Stoffe ist aus verschiedenen Gründen stark eingeschränkt.
- Ihre Anwendung erfolgt vorwiegend im stabilitätsgefährdeten wäßrigen Milieu.
- Sie werden überwiegend sehr niedrig dosiert.
- Geringfügige Konzentrationsverluste bedingen deshalb Einschränkungen bzw. Aufhebung ihrer Wirkung.
- Die notwendige Amphiphilie der Konservierungsmittel bewirkt zugleich Sorptionstendenzen an Bestandteile des Primärpackmittels.
- Stabilisierungsmaßnahmen für Konservierungsmittel sind wegen der damit verbundenen Einwirkung auf die Zusammensetzung und Verträglichkeit des Arzneimittels praktisch nicht möglich.
- Ihre analytische Erfassung neben höheren Wirkstoffmengen ist problematisch.
- Konservierungsmittel in den für Augentropfen sehr niedrigen Konzentrationen waren bisher chemisch schwer erfaßbar und sind deshalb häufig nur mikrobiologisch untersucht worden.
- Ihr Einsatz wird aus toxikologischen Gründen ebenso wie aus eher emotionalen Gründen zunehmend kritischer beurteilt.

Zu geringe praktische Erfahrungen und fast keine wissenschaftlichen Grundlagen sind ebenso auf dem Gebiet der vom Arzneibuch vorgeschriebenen Aufbrauchfrist nach Anbruch verfügbar. Die wenigen bekannten Ergebnisse befassen sich fast ausschließlich mit mikrobiologischen Fragestellungen. Untersuchungen der physikalischen und chemischen Instabilität im Zusammenhang mit der Anwendungszeit von Augenarzneimitteln liegen bisher nicht vor.

Wie bereits aus der Häufigkeit ihrer Verfalldaten ersichtlich, gehören wäßrige Augentropfen zu den mit Abstand besonders instabilen Arzneimitteln. Verschärfungen können dadurch bedingt sein, daß gerade während der Anwendung durch den Patienten Veränderungen auftreten. Beim Abtropfvorgang besteht Kontakt der Lösung mit Plastmaterialien der Primärverpackung. Ebenso werden durch Anbruch Inertbegasungen aufgehoben und damit unterbundene Oxidationsreaktionen möglich. Höhere Temperaturen können zusätzliche Sorptionsverluste auslösen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb, die wissenschaftlichen Grundlagen zur Beurteilung des Einsatzes von Konservierungsmitteln in wäßrigen Augentropfen zu erweitern, und damit Erfahrungen zur Problematik der chemischen und physikalischen Stabilität im Rahmen der Aufbrauchfrist zu sammeln. Die analytischen Voraussetzungen für diese Untersuchungen mußten in Form stabilitätsspezifischer Methoden für Konservierungsmittel erst geschaffen werden.

Zusätzlich sollte auch ein allgemein anwendbares quantitatives mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung von Augentropfen-Konservierungsmitteln erarbeitet werden. Dieses Verfahren mußte sowohl für reine Konservierungsmittellösungen als auch für die Fertigarzneimittel verwendbar sein, in welchen hohe Wirkstoffgehalte die Durchführung stabilitätsspezifischer Trennmethoden erschweren.

Mit diesen Methoden sollte die Beeinflussung der Stabilität und Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln durch die Herstellung von Augentropfen abgeklärt werden.

Weitere Untersuchungen waren dazu bestimmt, die Lagerfähigkeit rezepturüblicher Konservierungsmittel-Stammlösungen zur Herstellung von Augentropfen zu erfassen.

Zur Beurteilung des heutigen Qualitätsstandards von Ophthalmika sollten in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität von flüssigen Ophthalmika-Fertigarzneimit-

teln durchgeführt werden. In diesem Rahmen wurden die in der Bundesrepublik Deutschland verordneten Augentropfen, Augensäuer und homöopathischen Augentropfen auf pharmazeutische Qualitätsanforderungen der Arzneibücher, wie Sterilität, Konservierungsmaßnahmen, Tonizität, pH-Wert, Viskosität, Packmittel und Haltbarkeitsdauer untersucht.

B. Ergebnisse der Untersuchungen

I. Entwicklung von hochdruckflüssigkeitschromatographischen Analysemethoden zur stabilitätsspezifischen Analytik von Konservierungsmitteln in Augentropfen

Nach den Anforderungen der wichtigsten Pharmacopoeen (wie Ph. Eur., DAB 8/9, B.P. 80 oder USP XXI) müssen wäßrigen Augentropfenzubereitungen in Mehrdosenbehältnissen Konservierungsmittel zugesetzt werden.

Das Spektrum der hierfür anwendbaren Verbindungen reicht von Alkoholen über Guanidine und quartäre Ammoniumsalze bis zu Organoquecksilberverbindungen.

Da die erforderliche Konzentration und antimikrobielle Wirksamkeit dieser Hilfsstoffe für den vorgesehenen Verwendungszeitraum gewährleistet werden muß, bestehen für Konservierungsmittel im Prinzip ähnliche Anforderungen an die Stabilität wie für Wirkstoffe.

Als besondere Schwierigkeit bei der analytischen Überprüfung der Stabilität von Konservierungsmitteln erweist sich die häufig sehr geringe Anwendungskonzentration, welche die Bestimmung des intakten Moleküls neben auftretenden Abbauprodukten erschwert.

Ferner sind zahlreiche Bestimmungsmethoden für Konservierungsmittel in Augentropfen wegen ihrer mangelnden Stabilitätsspezifität für diese Zwecke nicht einsetzbar.

Wegen der hohen Empfindlichkeit ebenso wie wegen ihrer Stabilitätsspezifität bietet sich deshalb die Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Analytik von Konservierungsmitteln in Augentropfen an.

Bisher in diesem Zusammenhang publizierte Untersuchungen beschränken sich im wesentlichen auf Benzalkoniumchlorid (1,2), Chlorhexidin (3,4) und Thiomersal (5-7), während für die meisten anderen dafür verwendeten Konservierungsmittel bisher keine hochdruckflüssigkeitschromatographischen Untersuchungen veröffentlicht wurden. Hinzu kommt, daß die meisten der erwähnten Arbeiten infolge Verwendung selbstgefertigter Säulen

oder langer Retentionszeiten schwierig zu reproduzieren sind, oder den heutigen Anforderungen nicht mehr entsprechen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es deshalb geeignete hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungsmethoden für die häufigsten Konservierungsmittel in Augentropfen zu entwickeln.

Derartige, einfach durchführbare und sicher reproduzierbare Verfahren sollten zugleich zur Untersuchung der physikalischen und chemischen Stabilität von Konservierungsmitteln in Augentropfen herangezogen werden.

Im einzelnen waren folgende Anforderungen bei den zu entwickelnden Analysenmethoden zu erfüllen:

- rasche Durchführbarkeit
- kurze Analysenzeiten
- sichere Reproduzierbarkeit
- Stabilitätsspezifität
- Abtrennung möglicher Abbauprodukte
- in anwendungsüblichen Konzentrationen, möglichst ohne Verdünnungsschritte durchführbar.

1. Bestimmung alkoholischer Konservierungsmittel

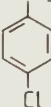
Zur Konservierung von wäßrigen Augenarzneimitteln werden Alkohole wie Chlorbutanol, β -Phenylethylalkohol, Benzylalkohol sowie seltener p-Chlorphenylethylalkohol und 2-Phenoxyethanol eingesetzt (Tab. 1).

Aufgrund ihrer Flüchtigkeit werden diese Verbindungen häufig gaschromatographisch bestimmt (8-12).

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, kann auch eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung nach dem Prinzip der reverse phase-Chromatographie mit einer Octadecylsilan-Säule als stationärer und einer Methanol-Phosphatpuffer-Mischung als mobiler Phase durchgeführt werden.

Zur Detektion konnte in allen Fällen ein UV-Festwellenlängendetektor mit 254 nm herangezogen werden. Lediglich bei Chlor-

butanol mußte die Wellenlänge 214 nm gewählt werden. Die übrigen alkoholischen Konservierungsmittel zeigten bei den in Augentropfen eingesetzten Konzentrationen eine so hohe Extinktion, daß zur HPLC-Bestimmung eine Verdünnung 1:10 erforderlich war.

Verbindung	Struktur und molare Masse ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	üblicher Konzentrationsbereich
Benzylalkohol	$\text{CH}_2\text{-OH}$  108,13	0,5 - 2%
Chlorbutanol 1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol	CH_3 $\text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}\text{Cl}_3$ OH 177,47	0,5 - 0,6%
p-Chlor- β -Phenyl-ethylalkohol	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$  157,61	0,3 - 0,4%
2-Phenoxyethanol Ethylenglykol-monophenylether	 138,16	0,5 - 2%
β -Phenylethyl-alkohol	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$  122,16	0,3 - 0,5%

Tab. 1 Übersicht über die untersuchten alkoholischen Konservierungsmittel für Augentropfen

Die Verwendung von Phosphatpuffer pH 7,2 erwies sich als nötig, um bei alkoholischen Konservierungsmitteln auftretende oxydative Abbauprodukte abzutrennen (Abb. 1). Säuren, die über Oxydation entstehen können, erscheinen bei reinen Methanol-Wasser-Mischungen als mobile Phase nur verzögert und mit deut-

Chromatographische Parameter	Konservierungsmittel				
	Benzyl- alkohol	Chlor- butanol	p-Chlorphenyl- ethylalkohol	β -Phenyl- ethylalkohol	2-Phenoxy- ethanol
Untersuchte Konzentration	1%	0,5%	0,4%	0,5%	1%
Probenkonzentration HPLC	0,1%	0,5%	0,04%	0,05%	0,1%
Trennsystem	1	1	1	2	1
Verhältnis Pumpe A:Pumpe B (%)	53:47	70:30	70:30	50:50	50:50
Durchfluß (ml/min)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Wellenlänge (nm)	254	214	254	254	254
Injektionsvolumen (μ l)/ Empfindlichkeit (a.u.f.s.)	25/0,5	40/0,2	55/0,5	40/0,08	30/0,2
k'	1,92	1,46	1,52	1,17	1,86
α	1,56	-	-	1,73	-
R	1,66	-	-	1,54	-
s_{rel} (%) n=10	0,63	0,69	0,60	0,62	0,59
s_{rel} (%) Aufbereitung n=10	0,81	-	0,78	0,76	0,78

Tab. 2 Chromatographische Parameter der HPLC-Bestimmung von alkoholischen Konservierungsmitteln

Trennsystem 1:

Stationäre Phase: Hibar 250-4 RP-18/10 μ m

Mobile Phase: Pumpe A: Methanol + 10% Phosphatpuffer
pH 7,2

Pumpe B: Phosphatpuffer pH 7,2

Trennsystem 2:

Stationäre Phase: Hibar 250-4 RP-18/10 μ m

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10% Phosphat-
puffer pH 7,2

Pumpe B: Phosphatpuffer pH 7,2

lichem Fronting im Chromatogramm. Im Falle von Phenylethanol ließ sich eine Abtrennung des Phenylacetaldehyds durch Austausch von Methanol gegen Acetonitril erzielen. Dieses besitzt bei der reversed-phase-Chromatographie wegen seiner geringeren Polarität gegenüber Methanol eine größere Elutionskraft (13).

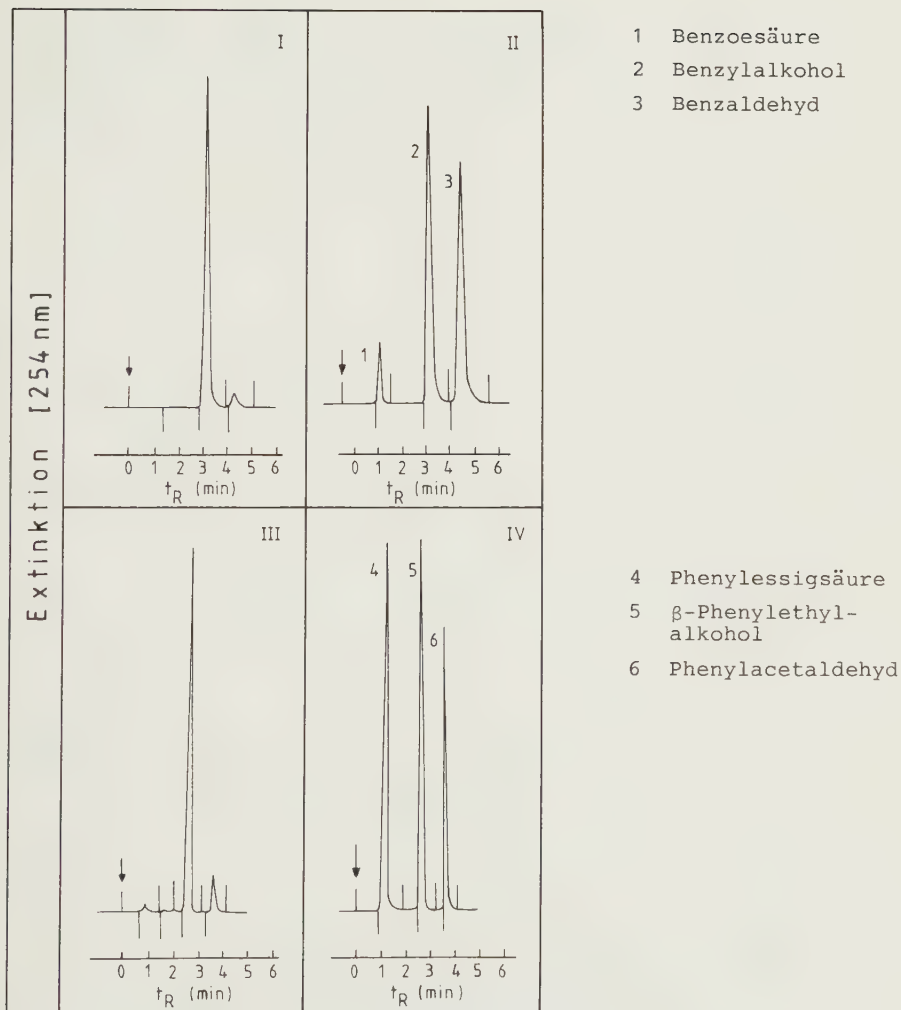


Abb. 1 HPLC-Trennung von Benzylalkohol und β -Phenylethyl-alkohol und ihrer Zersetzungsprodukte

- I Benzylalkohol
II Benzylalkohol und Zersetzungsprodukte
III β -Phenylethylalkohol
IV β -Phenylethylalkohol und Zersetzungsprodukte

Für Chlorbutanol ist eine Zersetzung zu Aceton, Kohlenmonoxid und Chloridionen neben Spuren von α -Hydroxybuttersäure beschrieben worden (14,15). Wie man in Abb. 2 erkennt, konnte hier die intakte Substanz neben Aceton erfaßt werden.

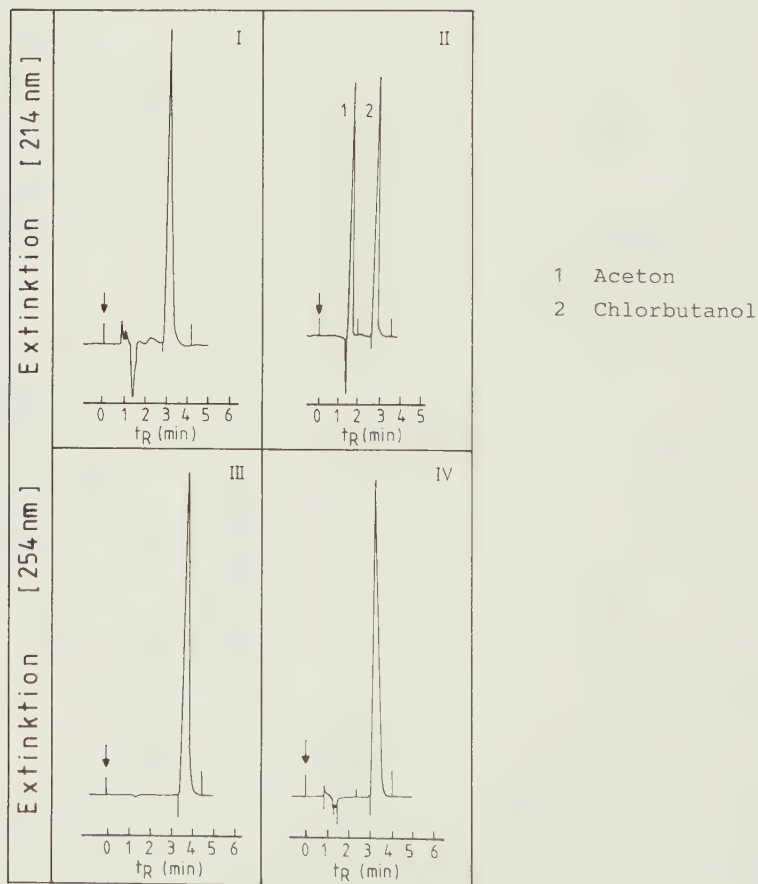


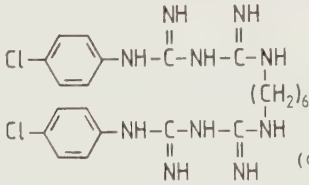
Abb. 2 HPLC-Trennung von Chlorbutanol, Phenoxyethanol und p-Chlor- β -Phenylethylalkohol

- I Chlorbutanol
- II Chlorbutanol mit Abbauprodukt Aceton
- III Phenoxyethanol
- IV p-Chlor- β -Phenylethylalkohol

Die hochdruckflüssigkeitschromatographische, stabilitätsspezifische Gehaltsbestimmung der seltener eingesetzten Alkohole p-Chlor- β -Phenylethylalkohol und Phenoxyethanol konnte mit dem beschriebenen Verfahren ebenfalls problemlos durchgeführt werden.

2. Bestimmung von Chlorhexidindiacetat und Chlorhexidindiglukonat

Konservierungsmittel vom Guanidin-Typ, wie Chlorhexidindiacetat und Chlorhexidindiglukonat, sind verhältnismäßig häufig gebrauchte kationische Verbindungen mit schwach oberflächenaktiven Eigenschaften. Sie werden insbesondere im DAC 79, im 2. AB-DDR und in der B.P. 80 als offizinelle Konservierungsmittel für Augentropfen beschrieben (Tab. 3).

Verbindung	Struktur und molare Masse ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Üblicher Konzentrationsbereich
Chlorhexidin 1,6-Di-(4-Chlorphenyldiguano)-hexan als - diacetat und - diglukonat	 $\text{NH} \quad \text{NH}$ $\parallel \quad \parallel$ $\text{NH}-\text{C}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}$ $\parallel \quad \parallel$ $\text{NH} \quad \text{NH}$ $625,6$ (Acetat) $(\text{CH}_2)_6$ $897,8$ (Glukonat)	0,01 - 0,05%

Tab. 3 Untersuchte Chlorhexidinsalze

Zur Bestimmung der beiden Chlorhexidinsalze wurde in der vorliegenden Untersuchung ein HPLC-Verfahren entwickelt, über dessen Parameter Tab. 4 Auskunft gibt.

Es beruht auf dem Prinzip der Ionenpaarchromatographie mit Heptansulfonsäure als Ionenpaarreagenz und einer Octadecylsilan-reversed-phase-Säule als stationärer Phase. Zur Verkürzung der Retentionszeit und Verbesserung der Peaksymmetrie wurden der mobilen Phase 10 mMol Dikaliumhydrogenphosphat zugesetzt. Wie aus der Literatur (16,17) bekannt, wirkt sich ein

Chromatographische Parameter	Konservierungsmittel	
	Chlorhexidinacetat	Chlorhexidinglukonat
untersuchte Konzentration	0,01%	0,01%
Trennsystem	1	1
Verhältnis (%) Pumpe A:Pumpe B	75 : 25	75 : 25
Durchfluß (ml/min)	2,00	2,00
Wellenlänge (nm)	260	260
Injektionsvolumen (µl)/Empfindlichkeit (a.u.f.s.)	35/0,32	45/0,32
k'	0,61	0,61
α	2,96	2,96
R	1,55	1,55
s _{rel} (%) n=10	0,59	0,61

Tab. 4 Chromatographische Parameter der HPLC-Bestimmung von Chlorhexidinsalzen

Trennsystem 1:

Stationäre Phase: Hibar 250-4 RP-18/10 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Methanol + 10% Fließmittel Pumpe B

Pumpe B: PIC B7-Reagenz, 10 mMol KH₂PO₄,
gepuffert auf pH 3,5

solcher Elektrolytzusatz verbessernd auf die Chromatographie basischer Substanzen auf reversed-phase-Säulen aus.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich, gelingt nach dem beschriebenen Verfahren auch die Abtrennung der Chlorhexidinsalze von ihrem bereits bekannten toxischen Abbauprodukt p-Chloranilin (18,19).

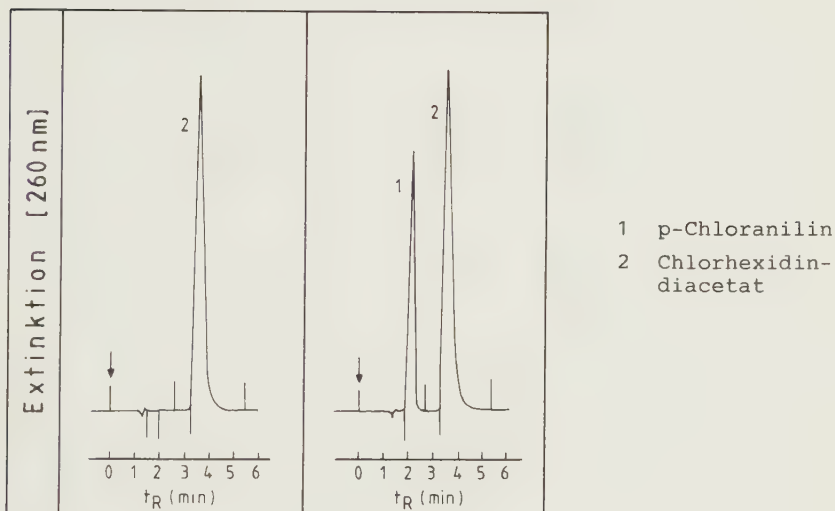


Abb. 3 HPLC-Trennung von Chlorhexidindiacetat und seines Zersetzungsproduktes p-Chloranilin

Das UV-Spektrum der Chlorhexidinsalze ist stark pH- und lösungsmittelabhängig. Im Fließmittelgemisch ließ sich, wie Abb. 4 zeigt, ein deutliches Maximum bei 260 nm beobachten. Durch die Wahl von 260 nm als Detektionswellenlänge, anstelle der beschriebenen Wellenlänge von 240 nm (3,4), konnte damit eine größere Empfindlichkeit der Methode erreicht werden.

Das neu entwickelte Verfahren stellt durch günstigere k' -Werte sowie kürzere Retentionszeiten eine deutliche Verbesserung dar.

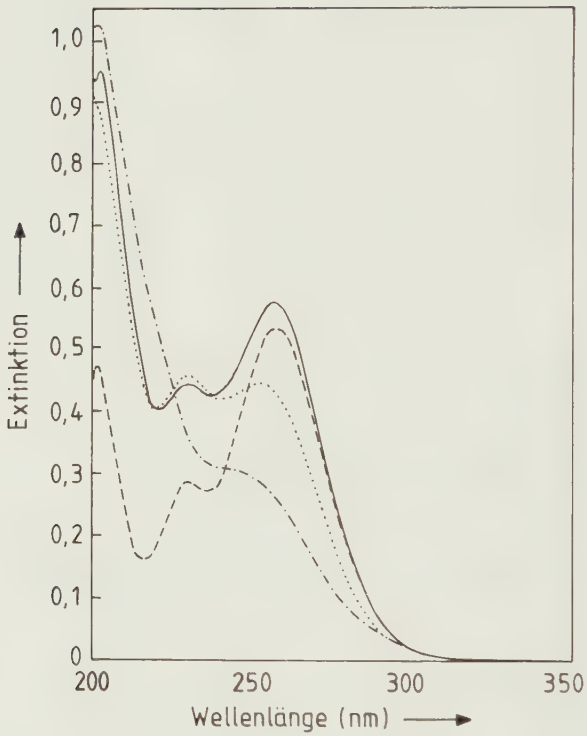


Abb. 4 Abhängigkeit der UV-Absorptionsspektren von Chlorhexidindiacetat von den verwendeten Lösungsmitteln

- 0,001% in Methanol:Wasser = 75:25
- 0,001% Lösung in Wasser
- 0,001% Lösung in Fließmittel (pH 3,5)
- · - · - DAC Methode (Zusatz von 0,1N H₂SO₄)

3. Bestimmung von quartären Ammoniumverbindungen

Benzalkoniumchlorid ist das in den Augentropfenfertigarzneimitteln in der Bundesrepublik Deutschland am häufigsten eingesetzte Konservierungsmittel. Neben Benzalkoniumchlorid finden noch verschiedene andere quartäre Ammoniumverbindungen Anwendung (Tab. 5).

Die Bestimmung amphiphiler und ionischer Stoffe auf reversed-phase-Säulen ist oft mit Schwierigkeiten verbunden (20-22), da durch unterschiedliche Bedingungen bei der Herstellung und aufgrund sterischer Hinderung bei der Umsetzung mit Chlorsilanen nie eine vollständige Silanisierung aller Si-OH-Gruppen gelingt (20,23). Es verbleiben so, je nach Hersteller, variierende Restgehalte an zugänglichen OH-Gruppen (24). Bedingt durch zurückbleibende freie Silanolgruppen können amphiphile und ionische Substanzen an reversed-phase-Säulen durch zwei verschiedene Adsorptionsmechanismen gebunden werden, da sowohl Wechselwirkungen mit hydrophoben Alkylfunktionen, als auch mit polaren Silanolgruppen stattfinden (25). Dieser Doppelmechanismus führt zu langen Retentionszeiten und schlechter Peaksymmetrie, eine Erscheinung, welche besonders bei Molekülen mit Aminfunktion auftritt (26).

Zur Umgehung dieser Schwierigkeiten und um herstellerbedingte Unterschiede im Trennverhalten auszuschließen (28), wurden zur Bestimmung ionischer und amphiphiler Substanzen bereits Analysenmethoden auf Kieselgel mit polaren wäßrigen Eluenten entwickelt (23,26-33).

Die freien Silanolgruppen lassen sich dabei durch Zusatz eines organischen Amins und eines anorganischen Salzes zum Eluenten blockieren.

Eine Bestimmung von Konservierungsmitteln vom Typ der quartären Ammoniumsalze mit Hilfe dieses Verfahrens wurde bisher, soweit uns bekannt, nicht beschrieben.

Zur Ausschaltung der freien Si-OH-Gruppen des Kieselgels wurde die stationäre Phase zunächst mit 300 ml einer 1%igen Lösung von Dibutylamin in Acetonitril/Wasser (3:1) gespült. Bei der

Verbindung	Struktur und molare Masse ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	üblicher Konzentrationsbereich
Benzalkon B Dichlorbenzyl-dimethyl-alkyl-ammoniumchlorid	$\left[\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl} \right] \text{Cl}^-$ 408,9	0,01 - 0,1%
Benzalkoniumchlorid N-Alkyl-N,N-dimethylbenzyl-ammoniumchlorid	$\left[\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \right] \text{Cl}^-$ ($n=7-17$) 354,0	0,01 - 0,1%
Benzethoniumchlorid Diisobutyl-phenoxyethoxy-ethyl-dimethylbenzyl-ammoniumchlorid	$\left[\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \right] \text{Cl}^-$ 448,0	0,01 - 0,1%
Cetalkoniumchlorid Cetyldimethylbenzyl-ammoniumchlorid	$\left[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \right] \text{Cl}^-$ 395,1	0,005 - 0,01%
Cetrimoniumbromid N-Hexadecyl-N,N-trimethylammoniumbromid, Cetrimid	$\left[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{N}^+}}-\text{CH}_3 \right] \text{Br}^{(-)}$ ($n = 11, 13, 15$) 336,4	0,01 - 0,1%
Cetylpyridiniumchlorid 1-Hexadecyl-pyridiniumchlorid	$\left[\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{15}-\overset{+}{\text{N}}-\text{C}_5\text{H}_5 \right] \text{Cl}^-$ 339,99	0,01 - 0,1%

Tab. 5 Untersuchte quartäre Ammoniumverbindungen

anschließenden Chromatographie wurde ebenfalls Dibutylamin, in der Konzentration von 20 mMol, der mobilen Phase zugesetzt.

Das trotz dieser Maßnahme auftretende Peak-Tailing konnte durch Zugabe von Dikaliumhydrogenphosphat zum polaren Eluenten und dessen Einstellung auf pH 5,0 mit Phosphorsäure beseitigt werden.

Als Detektion konnte bei allen untersuchten Substanzen ihre UV-Absorption ausgenutzt werden. Lediglich für Cetrimoniumbromid war aufgrund seiner Struktur eine Wellenlänge von 214 nm erforderlich.

Tab. 6 gibt die chromatographischen Parameter, Abb. 5 und 6 die Chromatogramme aller unter diesen Bedingungen untersuchten quartären Ammoniumverbindungen wieder.

Chromato- graphische Parameter	Konservierungsmittel					
	Benz- alkonium- chlorid	Benzalkon B	Benz- ethonium- chlorid	Cet- alkonium- chlorid	Cetri- monium- chlorid	Cetylpyri- dinium- chlorid
untersuchte Konzentration	0,01%	0,01%	0,01%	0,005% (0,01%)	0,1%	0,01%
Trennsystem	1	1	1	1	1	1
Verhältnis (%) Pumpe A:Pumpe B	50 : 50	45 : 55	50 : 50	47 : 53	50 : 50	50 : 50
Durchfluß (ml/min)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Wellenlänge (nm)	254	254	254	254	214	254
Injektions- volumen (µl)/ Empfindlich- keit (a.u.f.s.)	60/0,005	65/0,01	80/0,1	200/0,01	60/0,05	75/0,1
k'	2,19	3,92	2,24	2,30	2,52	3,26
s _{rel} (%) n=10	0,61	0,64	0,60	0,62	0,61	0,60

Tab. 6 Chromatographische Parameter der HPLC-Bestimmung von quartären Ammoniumverbindungen

Trennsystem 1:

Stationäre Phase: Rad Pak Si, 10 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10%

Wasser

Pumpe B: 20 mMol Dibutylamin, 10 mMol KH₂PO₄

mit H₃PO₄ eingestellt auf pH 5,0 , wäßrige Lösung

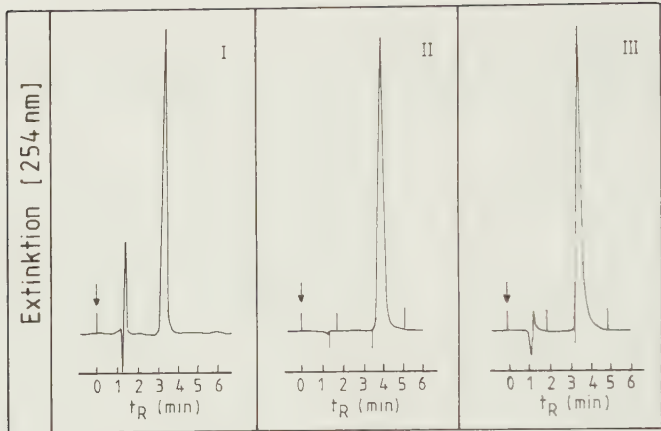


Abb. 5 HPLC-Chromatogramme von Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Benzethoniumchlorid

- I Benzalkoniumchlorid
- II Cetylpyridiniumchlorid
- III Benzethoniumchlorid

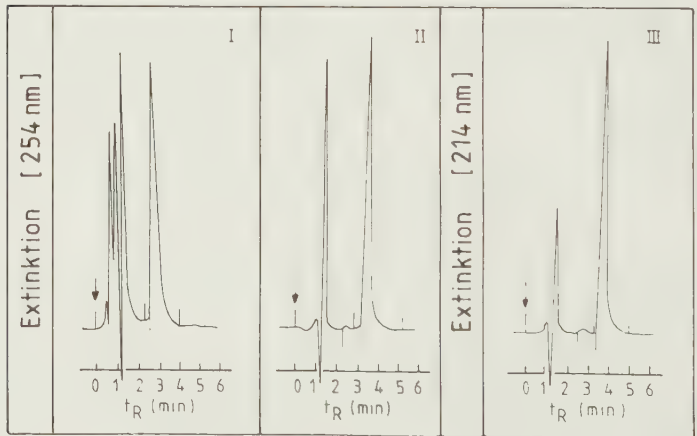


Abb. 6 HPLC-Chromatogramme von Cetalkoniumchlorid, Benzalkon B und Cetrimoniumbromid

- I Cetalkoniumchlorid
- II Benzalkon B
- III Cetrimoniumbromid

RICHARDS und MIZRAHI (34) stellten fest, daß Benzalkoniumchlorid des Handels eine unterschiedliche antimikrobielle Wirkung zeigen kann. Dies wird damit erklärt, daß die Alkylkette von C_8 bis C_{18} variieren kann, wobei das C_{14} -Homologe die beste antimikrobielle Wirkung besitzt. In diesem Sinne legt die USP den prozentualen Gehalt an C_{12} - und C_{14} -Homologen fest. Eine analytische Erfassung der einzelnen Homologen erschien deshalb wünschenswert.

Die Bestimmung der verschiedenen Kettenlängen des Benzalkoniumchlorids konnte auf zwei Wegen erreicht werden (Tab. 7). Einerseits mit einem reversed-phase-Verfahren unter Einsatz einer Octylsäule und einem Acetonitril-Puffergemisch pH 5,0. Nachteilig bei diesem Verfahren waren die langen Analysenzeiten und die ungünstige Peaksymmetrie, welche nur durch deutliche Verlangsamung der Papiergeschwindigkeit zu kompensieren war.

Andererseits mit dem bereits beschriebenen Verfahren mit Hilfe der belegten Kieselgelsäule. Allerdings war hierzu der Einsatz einer stationären Phase mit 5 μ m-Material und die extreme Veränderung des eingesetzten Acetonitril-Dibutylaminpuffer-Verhältnisses erforderlich. Diese zweite Methode zeigte deutlich kürzere Analysenzeiten sowie praktisch kein Tailing bei normaler Papiergeschwindigkeit.

In Abb. 7 sind die Chromatogramme beider Verfahren jeweils mit der USP-Referenz-Substanz und einer handelsüblichen Substanz gegenübergestellt.

Wie daraus hervorgeht wird einmal nach fallender das andere mal nach steigender Kettenlänge retendiert.

Bei der reversed-phase-Analytik (Chromatogramm III und IV) ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Substanzen mit längerer Kette und damit größerer Lipophilie werden wegen ihrer stärkeren Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial länger zurückgehalten.

Chromatographische Parameter	Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid USP-Referenz	
untersuchte Konzentration	0,01%	0,01%
Trennsystem	2	3
Verhältnis (%) Pumpe A:Pumpe B	55 : 45	90 : 10
Durchfluß (ml/min)	4,0	3,0
Wellenlänge (nm)	220	254
Injektionsvolumen (µl)/ Empfindlichkeit (a.u.f.s.)	75/0,02	100/0,01
$k'_{C_{12}}$	7,25	3,89
$k'_{C_{14}}$	9,88	3,54
$k'_{C_{16}}$	12,61	3,21
$\alpha_{C_{12}/C_{14}}$	1,36	1,10
$\alpha_{C_{14}/C_{16}}$	1,28	1,09
$R_{C_{12}/C_{14}}$	4,10	1,29
$R_{C_{14}/C_{16}}$	3,56	1,45

Tab. 7 Chromatographische Parameter der HPLC-Bestimmung von Benzalkoniumchlorid USP-Referenz Substanz

Trennsystem 2:

Stationäre Phase: Rad Pak C₈, 10 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10%

Phosphatpuffer pH 5,0;

Pumpe B: Phosphatpuffer pH 5,0, 15 mMol

Papiervorschub 0,25 cm/min

Trennsystem 3:

Stationäre Phase: Rad Pak Si, 5 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10% H₂O

Pumpe B: 20 mMol Dibutylamin, 10 mMol KH₂PO₄
mit H₃PO₄ eingestellt auf pH 5,0 , wäßrige Lösung

Papiervorschub 1 cm/min

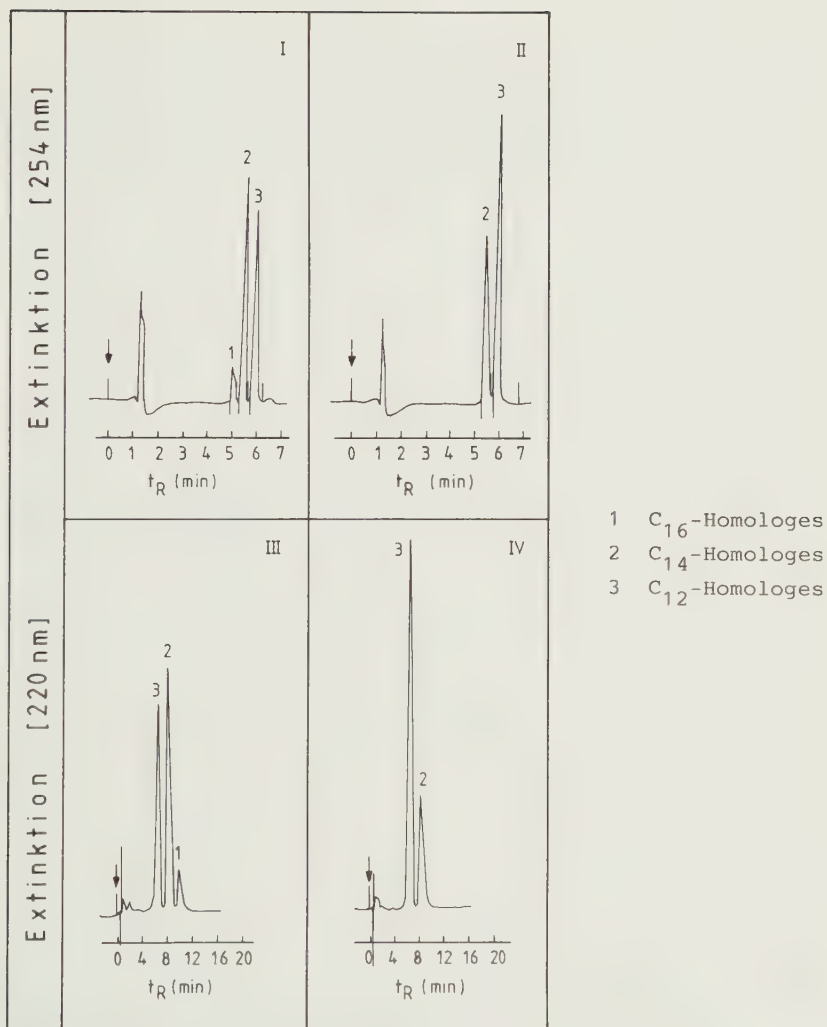


Abb. 7 Hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung verschiedener Kettenlängen des Benzalkoniumchlorids (chromatographische Parameter siehe Tab. 7)

- I USP-Referenz-Substanz, Trennsystem 1
- II handelsübliche Substanz 1, Trennsystem 1
- III USP-Referenz-Substanz, Trennsystem 2
- IV handelsübliche Substanz 2, Trennsystem 2

Die Bestimmung auf Kieselgel mit polaren Eluenten (Chromatogramm I und II) zeigt eine Umkehrung von reversed-phase- zu normal-phase-Bedingungen. Die Substanz mit der kürzeren Kette, also der größeren Hydrophilie, geht die stärkeren Wechselwirkungen mit dem belegten Kieselgelmaterial ein und erscheint im Chromatogramm an letzter Stelle.

Zur Überprüfung der Methoden mit Kieselgel und polarem Eluenten wurden handelsübliche Benzalkoniumchlorid-Substanzen mit der USP-Referenz-Substanz verglichen.

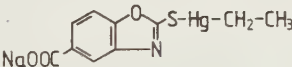
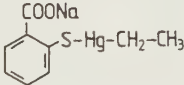
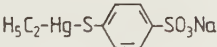
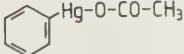
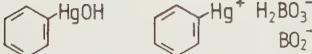
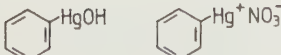
Probe	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	Bemerkung
I	0,8%	41,5%	49,1%	8,7%	USP-Referenz Substanz = 100%
II	-	63,6%	36,7%	-	Gesamt 100,3%
III	-	74,4%	22,9%	-	Gesamt 97,3%
IV	-	54,2%	34,3%	13,5%	Gesamt 102,0%

Tab. 8 Ermittlung der prozentualen Anteile der Homologen C₁₀-C₁₆ in verschiedenen, handelsüblichen Benzalkoniumchlorid-Substanzen

Wie Tab. 8 zeigt, entsprachen alle drei untersuchten Präparate den Anforderungen der USP, welche für das C₁₂-Homologe nicht weniger als 40%, für das C₁₄-Homologe nicht weniger als 20%. für beide zusammen aber einen Mindestgehalt von 70% fordert.

4. Bestimmung von Organoquecksilberverbindungen

Organische Quecksilberverbindungen (Tab. 9) stellen Konservierungsmittel von hoher Aktivität dar, die bereits in sehr geringen Konzentrationen mikrobistatisch, bei geeignetem pH-Wert teilweise mikrobizid wirksam sind.

Verbindung	Struktur und molare Masse ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	üblicher Konzentrationsbereich
Cialit® 2-(Ethyl-mercuri-mercapto)-benzoxazol-5-carbonsäure, Na-Salz	 445,8	0,005 - 0,02%
Thiomersal Ethylmercurithiosalicylat Na-Salz, Ethylquecksilber (II)-thiosalicylsäure-Natrium, Merthiolate	 404,9	0,002 - 0,02%
Timerfon® p-(Ethylmercuri-mercapto)-benzolsulfosäure, Na-Salz Natriumtimerfonat, Sulfomerthiolate, Thiocid	 440,8	0,005 - 0,02%
Phenylquecksilber (II)-Acetat	 336,74	0,001 - 0,02%
Phenylquecksilber (II)-Borat, Merfen® annähernd äquimol. Verbindung von Phenylquecksilber (II)-hydroxid (294,7) mit Phenylquecksilber (II)-orthoborat (338,5) bzw. Phenylquecksilber (II)-metaborat (320,5) oder einem Gemisch der beiden Borate	 294,7 338,5 320,5	0,001 - 0,02%
Phenylquecksilber (II)-Nitrat Äquimol. Gemisch von Phenylquecksilber (II)-nitrat und Phenylquecksilber (II)-hydroxid	 294,7 320,5	0,001 - 0,02%

Tab. 9 Übersicht der untersuchten Organoquecksilber-Konservierungsmittel

Wie aus Tab. 9 ersichtlich, lassen sich anionische und kationische Verbindungen unterscheiden.

Für die HPLC-Analytik ionischer Stoffe eignet sich insbesondere die Ionenpaarchromatographie (13). Der mobilen Phase wird ein organischer, ionischer Stoff zugegeben, welcher mit der entgegengesetzt geladenen Probenkomponente ein Ionenpaar bildet. Im strengen Sinne handelt es sich dabei um ein Salz, in seinem chromatographischen Verhalten aber um ein nichtionisches, organisches Molekül.

Zur Thiomersalbestimmung wurde die Ionenpaarchromatographie bereits herangezogen (6), jedoch ohne den Nachweis der Abtrennung der in der Literatur (35) beschriebenen Abbauprodukte. Für die anderen Konservierungsmittel der Tab. 9 sind bisher keine hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmungen bekannt geworden.

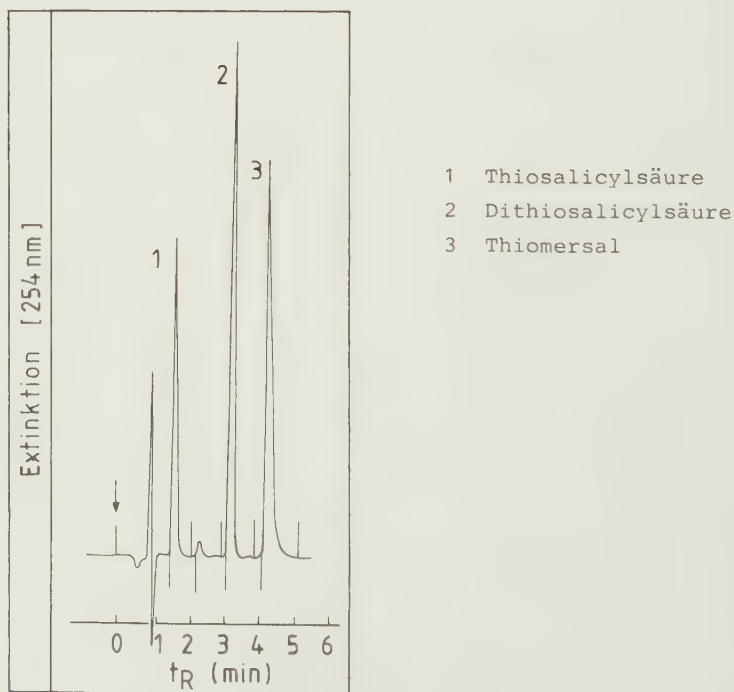


Abb. 8 HPLC-Trennung von Thiomersal, Dithiosalicylsäure und Thiosalicylsäure

Abb. 8 zeigt ein Chromatogramm von intaktem Thiomersal neben seinen Abbauprodukten Thiosalicylsäure und Dithiosalicylsäure. Die Trennung wird durch eine Octadecylsäule mit 5 μm -Material, Tetrabutylammoniumphosphat als Ionenpaarreagenz und einer Acetonitril-Puffermischung pH 7,5 erreicht. Mit den gleichen Bedingungen lassen sich auch zwei weitere anionische Organoquecksilberverbindungen, Cialit[®] und Timerfon[®], chromatographieren.

Bei allen drei Substanzen eignet sich wiederum ihre UV-Absorption zur Detektion.

Als schwieriger erwies sich die Detektion bei den kationischen Phenylquecksilbersalzen. Wie aus Abb. 9 hervorgeht, verschwindet bei einer in Augentropfen üblichen Konzentration von 0,002% das bei einer Konzentration von 0,02% noch sichtbare Maximum bei 258 nm mit seinen beiden Nebenmaxima. Bei 0,002% tritt jedoch

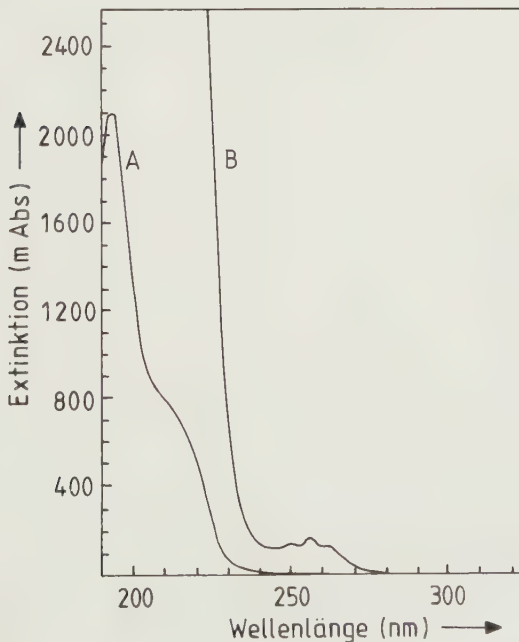


Abb. 9 UV-Spektren von Phenylquecksilberacetat in Abhängigkeit von der Konzentration

A: 0,002%ige Lösung in H_2O

B: 0,02%ige Lösung in H_2O

eine Schulter bei niedrigeren Wellenlängen auf, in deren Bereich eine Wellenlänge von 214 nm für die Bestimmung gewählt wurde.

Die Phenylquecksilbersalze sind als kationische Substanzen anzusehen und können deshalb mit Hilfe von Alkylsulfonaten als Ionenpaarreagenzien unter reversed-phase-Bedingungen bestimmt werden. Wegen des pK_a -Wertes von 3,3 (36) der Phenylquecksilbersalze mußte der pH-Wert 2,0 für die mobile Phase eingestellt werden. Dieser pH-Wert stellt einen Kompromiß zwischen Säulenstabilität und höchstmöglicher Dissoziation der Verbindung dar.

Einen Überblick über die chromatographischen Bedingungen zur Bestimmung der quecksilberhaltigen Konservierungsmittel in Augentropfen geben Abb. 10 und Tab. 10.

Chromatographische Parameter	Konservierungsmittel			
	Cialit [®]	Phenylquecksilbersalze	Thiomersal	Timerfon [®]
untersuchte Konzentration	0,01%	0,002%	0,002%	0,01%
Trennsystem	1	2	1	1
Verhältnis (%) Pumpe A:Pumpe B	40 : 60	55 : 45	40 : 60	40 : 60
Durchfluß (ml/min)	1,2	2,0	1,5	1,2
Wellenlänge (nm)	254	214	254	254
Injektionsvolumen (µl)/Empfindlichkeit (a.u.f.s.)	40/0,5	15/0,1	50/0,5	30/0,2
k'	1,47	2,84	3,68	2,96
s_{rel} (%) $n=10$	0,61	0,64	0,61	0,65

Tab. 10 Chromatographische Parameter der HPLC-Bestimmung von Organoquecksilberverbindungen

Trennsystem 1:

Stationäre Phase: Hibar 250-4 RP-18/5 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10% PIC-A-Puffer

Pumpe B: PIC-A-Puffer

Trennsystem 2:

Stationäre Phase: Hibar 250-4 RP-18/10 µm

Mobile Phase: Pumpe A: Acetonitril + 10% PIC B6-Low-UV-Puffer

Pumpe B: PIC B6-Low-UV-Puffer mit H_3PO_4 eingestellt auf pH 2,0

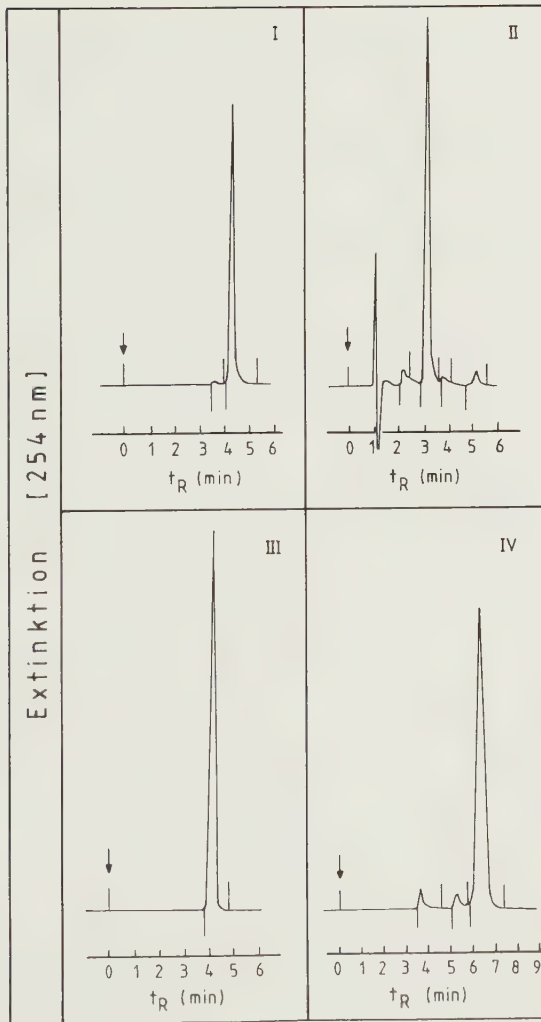


Abb. 10 HPLC-Bestimmung von Thiomersal, Phenylquecksilberacetat, Cialit® und Timerfon®

- I Thiomersal
- II Phenylquecksilberacetat
- III Cialit®
- IV Timerfon®

5. Möglichkeiten und Probleme der praktischen Anwendung

Wie am Beispiel der Konservierungsmittel ersichtlich ist, eignet sich die Hochdruckflüssigkeitschromatographie gut zur Bestimmung niedrig dosierter Hilfsstoffe. Ein großer Vorteil der entwickelten Methode ist darin zu sehen, daß mit Ausnahme von vier Verbindungen alle 16 einbezogenen Konservierungsmittel ohne weitere Verdünnungsschritte und Aufbereitungsverfahren direkt analysiert werden konnten. Diese Tatsache ist auch der Grund für die beobachteten niedrigen Standardabweichungen.

Anhand von Chlorbutanol und den Phenylquecksilbersalzen wurde gezeigt, daß eine Detektion bei niedrigen Wellenlängen im Rahmen der HPLC mit Hilfe moderner Detektoren gut durchführbar ist. Noch vor wenigen Jahren wurde eine HPLC-Analyse von nicht UV-absorbierenden Substanzen für äußerst schwierig, wenn nicht gar für unmöglich gehalten (37).

Für alkoholische Konservierungsmittel ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie eine Alternative zur Gaschromatographie.

Die für quartäre Ammoniumverbindungen eingesetzte Methode auf mit Amin modifiziertem Kieselgel weist folgende Vorteile auf:

- nicht aufwendiger als bei Verwendung chemisch gebundener reversed-phase-Materialien, jedoch kostengünstiger
- gute Reproduzierbarkeit, auch bei Säulenmaterialien verschiedener Hersteller (vergleiche hierzu (32))
- lange Lebensdauer von Kieselgelsäulen
- kürzere Analysenzeiten als bei reversed-phase-Verfahren
- Trennung verschiedener Alkylhomologer möglich

Die Anwendungsmöglichkeit der dargestellten Verfahren kann bei der Direktbestimmung in Fertigarzneimitteln durch die Ungleichgewichtigkeit von Wirkstoffen und Konservierungsmitteln eingeschränkt sein. Dies tritt vor allem dann auf, wenn Konservierungsmittel und Arzneistoff bei gleichen Wellenlängen sorbieren.

In vollem Umfang anwendbar bleibt das hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungsverfahren, wenn:

- UV-Maxima von Wirkstoff und Konservierungsmittel nicht die gleiche Wellenlänge besitzen
- anorganische Wirkstoffe vorliegen
- Entwicklungsprüfungen von Konservierungsmitteln in isotonischen Trägerlösungen vorgenommen werden
- Prüfungen der physikalischen und chemischen Stabilität reiner Konservierungsmittellösungen durchgeführt werden

Im Falle von Überlagerungen von Wirkstoff und Konservierungsmittel könnten folgende Möglichkeiten zur Behebung dieser Schwierigkeiten in Frage kommen:

- Einsatz anderer, selektiverer Detektoren
- Derivatisierung
- Entfernen störender Wirkstoffe durch chemische oder physikalische Methoden

II. Entwicklung einer mikrobiologischen Methode zum quantitativen Nachweis von Konservierungsmitteln in Augentropfen

Wirkstoffe in wäßrigen Ophthalmika sind in der Regel erheblich höher konzentriert als deren Konservierungsmittel.

Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie können dadurch Schwierigkeiten auftreten, da Konservierungsmittel neben hohen Wirkstoffkonzentrationen nur schwer quantitativ erfaßbar sind.

Es lag deshalb nahe, die antimikrobielle Wirkung der Konservierungsmittel zu ihrer quantitativen Bestimmung heranzuziehen. Eine dazu geeignete Methode ist der quantitative Agardiffusionstest.

Als Hemmzonentest, seiner gebräuchlichsten Variante, gehört er zu den Standardmethoden der Arzneibücher zur Wertbestimmung von Antibiotika und Chemotherapeutika. Dieser Diffusionstest bietet zugleich auch die Möglichkeit, diffundierbare Konservierungsmittel auf einem mit Testkeimen beimpften Agar nachzuweisen (38,39 40). Wichtig war in diesem Zusammenhang, daß die Konservierungsmittel auch in ihren üblichen, relativ geringen Anwendungskonzentrationen, bestimmbar sein mußten.

1. Überprüfung der Eignung des Agardiffusionstests für Konservierungsmittel in Augentropfen

Nicht alle Stoffe sind dazu befähigt in das Agarmedium zu diffundieren. Es war deshalb erforderlich, alle Augentropfen-Konservierungsmittel auf ihre Diffusionseigenschaft zu prüfen, um auswertbare Eichgeraden erhalten zu können.

Als Testkeim fand *Bacillus subtilis* Verwendung, da er allgemein als apathogen gilt, als Sporensuspension vorliegt und gut lagerfähig ist.

Testplatte	: 243 x 243 mm
Agar	: Antibiotika-Agar Nr. 5 pH 7,9 Fa. Merck
Schichtdicke	: 4 mm
Inokulum	: Bacillus subtilis ATCC 6633
Einsaatdichte	: 10^7 /ml
Lochdurchmesser:	8 mm
Auftragevolumen:	100 µl
Test-Schema	: 12 x 3
Bebrütungsdauer:	16 h
Bebrütungstemp.:	31°C

Tab. 11 Testbedingungen für den Agardiffusionstest von Augentropfen-Konservierungsmitteln

Die Verwendung großer quadratischer Testschalen (243 x 243 mm) erlaubte ein 12 x 3 Testschema in 36 Stanzlöchern. Es konnten somit neben einer Eichgerade aus 4 Werten zugleich 8 Testlösungen aufgetragen werden. Nach einem randomisierten Schema ist dabei jeder der zwölf Werte 3x auf der Platte vertreten.

Konservierungsmittel	Konz.(%)	Konservierungsmittel	Konz.(%)
Benzalkoniumchlorid	0,01	Chlorhexidinsalze	0,01
Benzethoniumchlorid	0,1	Cialit®	0,01
Cetalkoniumchlorid	0,005	Phenylquecksilbersalze	0,002
Cetrimoniumbromid	0,1	Thiomersal	0,002
Cetylpyridiniumchlorid	0,01	Timerfon®	0,01

Tab. 12 Mit dem Agardiffusionstest bestimmbare Augentropfen-Konservierungsmittel

Bei den in Tab. 12 zusammengefaßten Konservierungsmitteln ist der Agardiffusionstest zu ihrer quantitativen Bestimmung gut verwendbar.

Keine Hemmhöfe konnten für alkoholische Konservierungsmittel wie Chlorbutanol, Phenylethylalkohol, Benzylalkohol, Phenoxyethanol, Kresol sowie PHB-Ester erzielt werden.

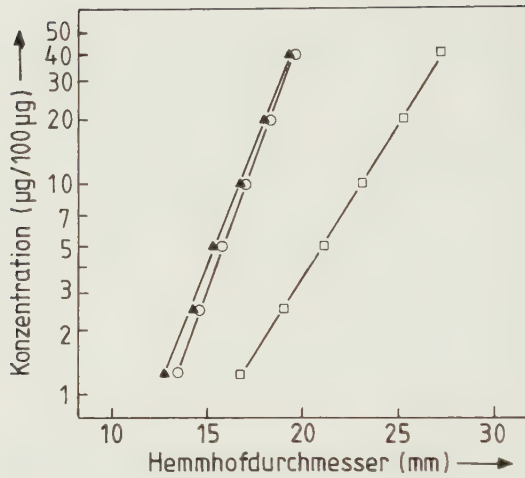


Abb. 11 Eichgeraden von Benzalkoniumchlorid und den Chlorhexidinsalzen im Agardiffusionstest

- △- Benzalkoniumchlorid
- Chlorhexidindiaceat
- Chlorhexidindiglukonat

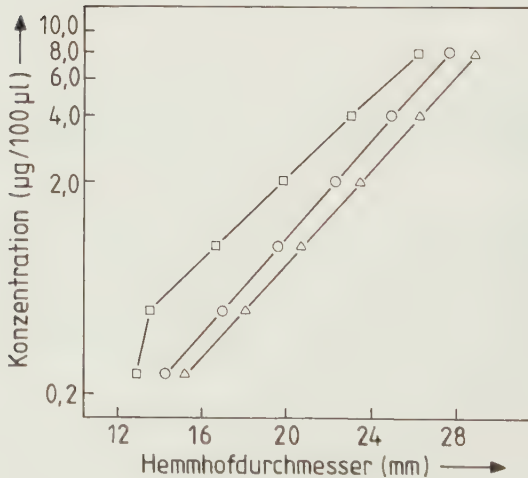


Abb. 12 Eichgeraden von Thiomersal, Phenylquecksilberacetat und -borat im Agardiffusionstest

- Thiomersal
- Phenylquecksilberacetat
- △- Phenylquecksilberborat

Cetylpyridiniumchlorid ergab zu kleine und damit nicht mit genügender Genauigkeit ausmeßbare Hemmhöfe.

Wie aus Abb. 11 und 12 am Beispiel der vier wichtigsten Augentropfen-Konservierungsmittel ersichtlich ist, zeigen die Organoecksilberverbindungen die flachsten Eichgeraden. Bei ihnen verursachen geringe Konzentrationsunterschiede bereits große Veränderungen im Hemmhofdurchmesser. Über relativ steile Eichgeraden verfügen die Chlorhexidinsalze. Sie sind jedoch im Vergleich zu denen mancher Antibiotika noch als gut zu bezeichnen.

2. Einflüsse auf den Agardiffusionstest für Konservierungsmittel in Augentropfen

Die Steilheit der Eichgeraden im Agardiffusionstest ist nicht nur von der chemischen Struktur der Substanz, sondern auch von anderen Einflußfaktoren abhängig. So können Parameter wie Schichtdicke des Agars, Einsaatdichte, Bebrütungstemperatur und Vordiffusion Veränderungen hervorrufen.

Bei der vorliegenden Methode wurden diese Testbedingungen jeweils konstant gehalten. Trotzdem traten auch bei gleich behandelten Platten noch Unterschiede im Hemmhofdurchmesser auf. Dies konnte mit großen Testplatten, die 36 Stanzlöcher ermöglichen, behoben werden. Diese erlauben eine Eichgerade auf jeder Platte und besitzen noch genügend Auftragsmöglichkeiten für die zu untersuchenden Substanzen.

Bei der Untersuchung von Fertigarzneimitteln war ferner abzuklären, ob der pH-Wert bzw. Wirk- und Hilfsstoffe die Ergebnisse des Agardiffusionstests beeinflussen.

2.1 Einfluß des pH-Wertes

Durch Protonierung bzw. Deprotonierung von Substanzen kann sowohl deren Diffusionsfähigkeit im Agar, als auch ihre Wirkung auf Mikroorganismen verändert werden.

Die Konservierungsmittel wurden deshalb zur Überprüfung des pH-Einflusses in Puffern mit verschiedenen pH-Werten gelöst und

davon drei Eichgeraden mit unterschiedlichen pH-Werten auf einer Testplatte untersucht. Nach sechzehnständiger Bebrütung bei 31°C wurden die Hemmhöfe ausgemessen und halblogarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen.

Wie aus Abb. 13 bis 16 hervorgeht, besitzt der pH-Wert einen Einfluß auf den Agardiffusionstest von Konservierungsmitteln. Bei niedrigen pH-Werten sind die Eichgeraden in der Regel flacher. Mit steigendem pH-Wert nimmt ihre Steilheit zu. Im untersuchten Bereich von pH 6-9 hingegen sind die Eichgeraden in den meisten Fällen nahezu identisch und weisen die gleiche Steilheit auf. Lediglich bei Chlorhexidinsalzen ergeben sich große Unterschiede im Hemmhofdurchmesser. Bei ihnen wurden auch wegen ihrer problematischen Löslichkeit in den Puffern die Untersuchungen nur bei zwei pH-Werten dargestellt.

Die meisten Konservierungsmittel verfügen nur über eine protonierbare funktionelle Gruppe und ihre pK_a -Werte liegen im sauren Bereich. Mit zunehmender Deprotonierung im schwach sauren, neutralen und alkalischen Milieu treten nur noch geringfügige Veränderungen auf und die Diffusionsfähigkeit wird weniger stark beeinflusst.

Bei den Untersuchungen von Fertigarzneimitteln ist deshalb eine Einstellung des pH-Wertes erforderlich. Im pH-Bereich von 6-9 ist dabei eine annähernde Einstellung ausreichend. Unterhalb von pH 6 ist diese exakt vorzunehmen.

Die pH-Einstellung kann dadurch erfolgen, daß der pH-Wert des Fertigarzneimittels gemessen und die Eichgerade in einem Puffer dieses pH-Wertes erstellt wird. Eine zweite Möglichkeit läßt sich nur bei ungepufferten Zubereitungen anwenden. Dabei wird die Eichgerade mit einer bestimmten Pufferlösung hergestellt, und das Fertigarzneimittel mit dem gleichen Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wird der pH-Wert überprüft, da eine Pufferung durch den Wirkstoff des Fertigarzneimittels so hoch sein könnte, daß der gewünschte pH-Wert nicht erreicht wird.

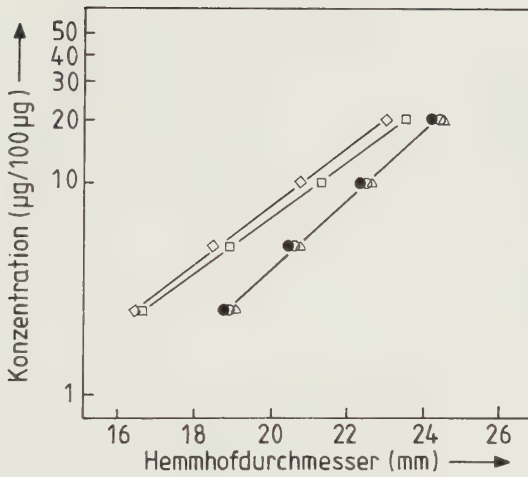


Abb. 13 Einfluß verschiedener pH-Werte auf den Agar-diffusionstest von Benzalkoniumchlorid

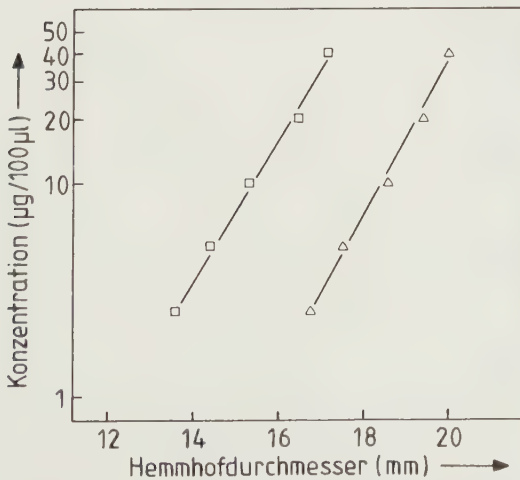


Abb. 14 Einfluß verschiedener pH-Werte auf den Agar-diffusionstest von Chlorhexidindiacetat

- ◇- pH 3,0
- pH 4,5
- △- pH 6,0
- pH 7,5
- pH 9,0

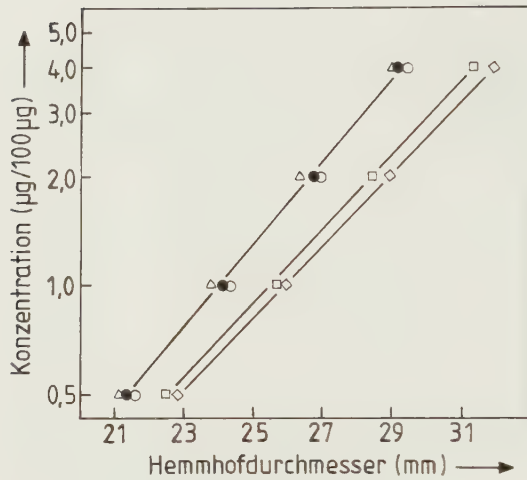


Abb. 15 Einfluß verschiedener pH-Werte auf den Agar-diffusionstest von Phenylquecksilberborat

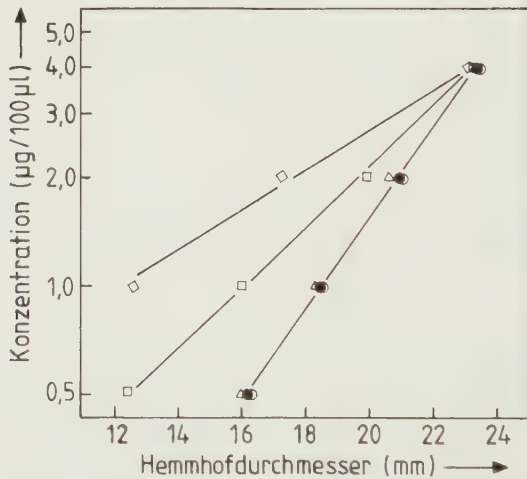


Abb. 16 Einfluß verschiedener pH-Werte auf den Agar-diffusionstest von Thiomersal

- ◇- pH 3,0
- pH 4,5
- △- pH 6,0
- pH 7,5
- pH 9,0

2.2 Einfluß von Wirk- und Hilfsstoffen

Auch Wirk- und Hilfsstoffe können im Agardiffusionstest Hemmhöfe erzeugen. Dies muß nicht auf einer antimikrobiellen Wirkung im strengen Sinne beruhen, sondern kann auch durch ungünstige Wachstumsbedingungen für den Testkeim bedingt sein. *Bacillus subtilis* ist hierbei besonders empfindlich.

Hilfsstoff	übliche Konzentration	Löslichkeit in H ₂ O	Hemmhof
Ascorbinsäure	10%	in 3,5 T	+
Borax	2,65% isoton.	in 20 T	-
Borsäure	ca. 1,9% isoton.	in 20 T (20°C) in 4 T (100°C)	+
Dinatriumhydrogenphosphat	1,85%		-
Glucose (wasserfrei)	5,0% isoton. 40% zum Entquellen	in 1,5 T	-
Kaliumchlorid	1,21% isoton.	in 3 T	-
Kaliumhydrogenphosphat	2,15% isoton.	in 6 T	-
Kaliumnitrat	1,6 % isoton.	in <1 T	-
Mannit	5,3 % isoton.	in 5,5 T	-
Methylcellulose	0,5%	löslich	+
Natriumacetat·3H ₂ O	2 % isoton.	in 1 T	-
Natriumchlorid	0,9 % isoton.	in 3 T	-
Natriumhydrogencarbonat	1,39% isoton.	in 12 T	-
Natrium-EDTA	0,01 - 2 %	in 11 T	+
Natriumnitrat	1,36% isoton.	in 1,3 T	-
Natriumthiosulfat	0,05%	in <1 T	-
Polyvinylalkohol	1,4 %	schwer lösl.	+
Polyvinylpyrrolidon	3,5 %	in 1,7 T	-

Tab. 13 Überprüfung von Hilfsstoffen auf hemmhofbildende Eigenschaften im Agardiffusionstest

Arzneistoff	übliche Konzentration	Löslichkeit in H ₂ O	Hemmhof
Adrenalinbitartrat	0,5 - 2%	in 3 T	-
Antazolinhydrochlorid	0,5%	in 50 T	+
Atropinsulfat	0,2 - 4%	in 1 T	+
Befunololhydrochlorid	0,5%	-	+
Bupranololhydrochlorid	0,5%	-	+
Butacainsulfat	1 - 2%	<1 T	+
Carbachol	0,01- 3%	in 1 T	-
Cyclopentolathydrochlorid	0,5 - 2%	<1 T	+
Cystein	3,5%	schwer lösl.	+
Diphenhydraminhydrochlorid	0,1 - 0,2%	in 2,5 T	+
Dipivefrin	0,1%	-	+
Ephedrinhydrochlorid	2 - 5%	in 4 T	+
Fluorescein-Natrium	1 - 2%	in 1,5 T	-
Homatropinhydrochlorid	1 - 5%	in 7 T	+
Kaliumjodid	1 - 2%	in 0,75 T	-
Kupfersulfat	0,1 - 0,2%	in 3 T	+
Lidocainhydrochlorid	2 - 4%	in 0,7 T	+
Methylenblau	0,002-0,04%	in 40 T	+
Naphazolinhydrochlorid	0,025-0,1%	in 6 T	+
Natriumchromoglycat	2%	in 20 T	+
Natriumjodid	1 - 2%	in 0,5 T	+
Neostigminbromid	1 - 5%	in ca. 0,5 T	+
Oxybuprocainhydrochlorid	0,2 - 1%	leicht lösl.	+
Paraoxon	1,66%	Verreibung mit NaCl	-
Phenylephrinhydrochlorid	0,1 - 10%	in 2 T	+
Physostigminsalicylat	0,25- 1%	in 90 T	-
Pilocarpinhydrochlorid	0,25- 10%	in <1 T	-
Proxymetacainhydrochlorid	0,5%	in 30 T	+
Scopolaminhydrobromid	0,2 - 0,5%	in 4 T	-
Tetracainhydrochlorid	0,5 - 1%	in 7,5 T	+
Tetryzolinhydrochlorid	0,05- 0,1%	in 3,5 T	-
Tolazolinhydrochlorid	bis 10%	in 0,5 T	+
Trifluorthymidin	1 - 2%	in ca. 25 T	+
Xylometazolinhydrochlorid	0,05- 0,1%	in 33 T	+
Zinksulfat	0,25- 0,5%	in 0,7 T	+

Tab. 14 Überprüfung von Wirkstoffen für Ophthalmika auf hemm-
hofbildende Eigenschaften im Agardiffusionstest

Häufig in Ophthalmika eingesetzte Wirk- und Hilfsstoffe wurden deshalb daraufhin geprüft, ob sie unter den gewählten Testbedingungen Hemmhöfe verursachen.

Die meisten der in Tab. 13 aufgeführten, größtenteils zur Isonisierung eingesetzten Hilfsstoffe, zeigten keine Hemmhöfe. Anders verhielten sich Wirkstoffe (Tab. 14). Hier verursacht der überwiegende Teil deutliche Hemmhöfe, bedingt durch die hohe Empfindlichkeit des *Bacillus subtilis*.

Eine Überprüfung des Konservierungsmittelgehalts in Fertigarzneimitteln ist jedoch trotzdem möglich.

Wie aus Abb. 65 bis 68 am Beispiel der Borsäure hervorgeht, muß eine solche hemmhofbildende Wirk- oder Hilfsstoffsubstanz die Eichgerade eines Konservierungsmittels nicht verändern. Im Falle von Benzalkoniumchlorid, Phenylquecksilberborat und Thiomersal sind die Eichgeraden in Phosphatpuffer pH 5,0 praktisch identisch mit jenen in 1,9%iger Borsäurelösung. Lediglich bei Chlorhexidindiacetat ist der Einfluß der Borsäure so stark, daß eine störungsfreie Bestimmung nicht mehr möglich ist.

Vor der Ermittlung des Konservierungsmittelgehalts in Fertigarzneimitteln müssen alle Einflüsse der anderen Rezepturbestandteile abgeklärt werden. Dabei muß jeder einzelne Bestandteil auf hemmhofbildende Eigenwirkung untersucht werden. Besitzt er eine solche, muß sein Einfluß auf die Eichgerade des jeweiligen Konservierungsmittels ausgetestet werden. Wenn sich dabei keine Veränderung im Vergleich mit einer reinen Konservierungsmittellösung ergibt, ist eine Gehaltsbestimmung mit Hilfe des Agar-diffusionstests möglich.

3. Überprüfung von Konservierungsmittelgehalten in Fertig- arzneimitteln mit Hilfe des Agardiffusionstests

Die überprüften Zubereitungen waren entweder reine Konservierungsmittellösungen oder besaßen Wirk- und Hilfsstoffe, welche keinen Einfluß auf die Eichgeraden der Konservierungsmittel nehmen.

Wie die Untersuchungen ergaben, wurde überwiegend der deklarierte Gehalt an Konservierungsmitteln in den Grenzen des methodenbedingten Fehlers wiedergefunden.

Überdosierungen können Herstellungszuschläge darstellen, mit denen etwaige Stabilitäts- und Sorptionsverluste ausgeglichen werden können. Gehaltsschwankungen sind jedoch auch durch die schwierige Einwaage der geringen Konservierungsmittelmengen im Vergleich zu hohen Wirkstoffmengen bedingt.

Benzalkoniumchlorid ist das in Augentropfenpräparaten am häufigsten eingesetzte Konservierungsmittel.

Wie aus Tab. 15 zu entnehmen ist, treten im Vergleich mit der deklarierten Konzentration Unterschiede auf. Dabei können mit dem Agardiffusionstest bei 57% der Fertigarzneimittel Überdosierungen von 1-36% festgestellt werden. Bei 29% der Fertigarzneimittel lag der Gehalt 1-20% unter dem deklarierten Wert.

Bei Gegenüberstellung der mit HPLC und Agardiffusionstest erhaltenen Ergebnisse läßt sich erkennen, daß diese nicht immer übereinstimmen. Sie zeigen sogar in 50% der Fälle gegenläufige Tendenz. Diese lassen sich neben den oben erwähnten Ursachen auch auf die hohe Grenzflächenaktivität des Benzalkoniumchlorids zurückführen, da besonders leicht Pipettierfehler bei der Durchführung des Agardiffusionstests unterlaufen. Die Resultate bei Desinfektionslösungen zeigen, daß die Konservierungsmittel in Abwesenheit weiterer Arznei- und Hilfsstoffe besser zu bestimmen sind.

Präparat	deklarierte Konzentration (mg/ml)	ermittelte Konzentration	
		HPLC (mg/ml)	ADT (mg/ml)
B1	0,1	0,102	0,08
B2	-	0,052	0,048
B3	0,1	-	0,116
B4	0,1	-	0,095
B5	0,05	-	0,068
B6	0,2	-	0,207
B7	0,2	-	0,018
B8	0,1	-	0,11
B9	-	-	0,121
B10	-	-	0,217
B11	-	-	0,105
B12	-	-	0,09
B13	-	-	0,06
B14	-	-	0,185
B15	0,2	0,202	0,20
B16	0,1	0,104	0,12
B17	0,1	0,1	0,095
B18	0,1	0,129	0,135
B19	130	135	130
B20	100	110	110
B21	95	-	96

Tab. 15 Vergleichende Bestimmung von Benzalkoniumchlorid in Fertigarzneimitteln mit Hilfe der Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC) und des Agar-diffusionstests (ADT)

B1 - B16 Augentropfenpräparate
 B17 - B18 Kontaktlinsenlösungen
 B19 - B21 Desinfektionslösungen

Bei den chlorhexidinhaltigen Präparaten (Tab. 16) wurden vor allem Gurgellösungen und Desinfektionsmittel untersucht. Die Spezialitäten enthalten 0,1-10%ige wäßrige Lösungen von Chlor-

Präparat	deklarierte Konzentration (mg/ml)	ermittelte Konzentration	
		HPLC (mg/ml)	ADT (mg/ml)
C1	0,05	-	0,054
C2	0,05	0,01	0,008
C3	0,05	0,04	0,039
C4	-	-	0,082
C5	0,05	0,031	0,027
C6	1	1,1	0,989
C7	3	3	2,97
C8	20	19,63	19,59
C9	20	19,92	19,79
C10	100	107	111
C11	100	101	98,6
C12	10	12	11
C13	40	40	39,6
C14	4,3	4,2	4,1

Tab. 16 Vergleichende Bestimmung von Chlorhexidin in Fertigarzneimitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und des Agardiffusions-tests (ADT)

C1 - C4 Augentropfenpräparate
 C5 Augenwasserpräparat
 C6 - C9 Gurgellösungen
 C10 - C11 Gurgelkonzentrate
 C12 - C14 Desinfektionslösungen

hexidinglukonat und besitzen im allgemeinen keine weiteren Hilfsstoffzusätze, welche die mikrobiologische Gehaltsbestimmung stören könnten. Deshalb wurden hier trotz steiler Eichgerade nur geringe Abweichungen vom deklarierten Gehalt gefunden.

Bei den Augentropfenpräparaten weichen die Werte teilweise deutlich ab und zeigen eine Unterdosierung von 22-84%. Bestä-

tigt wird dies durch die teilweise ebenfalls durchgeführte hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung, über Mindestgehalte bei chlorhexidinhaltigen Zubereitungen wurde bereits berichtet (68, 73). Als Ursache hierfür kann eine mögliche Umwandlung in schlechter lösliche Salze mit anschließender Ausfällung in Frage kommen.

Präparat	deklarierte Konzentration (mg/ml)	ermittelte Konzentration	
		HPLC (mg/ml)	ADT (mg/ml)
P1	0,02	-	0,013
P2	-	-	0,006
P3	-	-	0,013
P4	0,702	0,705	0,71
P5	0,702	0,71	0,73
P6	0,702	0,689	0,64
P7	0,7	0,69	0,682

Tab. 17 Vergleichende Bestimmung von Phenylquecksilber-salzen in Fertigarzneimitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und des Agardiffusionstests (ADT)

P1 - P3 Augentropfenpräparate
P4 - P6 Desinfektionslösungen
P7 Haut- und Wundantiseptikum

Von der Deklaration abweichende Konservierungsmittelkonzentrationen, die von -35% bis +4% reichten, zeigten auch phenylquecksilberhaltige Augentropfenpräparate (Tab. 17). Die untersuchten Desinfektionslösungen entsprachen hingegen der angegebenen Menge.

Da Phenylquecksilbersalze, vor allem -Acetat- und -Nitrat schlecht wasserlöslich sind (36), können möglicherweise bei der Herstellung nicht gelöste Anteile durch die Sterilfiltration zurückgehalten werden.

Präparat	deklarierte Konzentration (mg/ml)	ermittelte Konzentration	
		HPLC (mg/ml)	ADT (mg/ml)
T1	0,04	0,029	0,036
T2	-	0,01	0,013
T3	0,01	-	0,005
T4	0,01	-	0,015
T5	0,01	-	0,012
T6	0,02	-	0,021
T7	0,01	-	0,0096
T8	0,02	0,019	0,021
T9	0,023	0,021	0,029
T10	0,01	0,0073	0,011

Tab. 18 Vergleichende Bestimmung von Thiomersal in Fertig-
arzneimitteln mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-
chromatographie (HPLC) und des Agardiffusions-
tests (ADT)

T1 - T 7 Augentropfenpräparate
T8 Augenwasserpräparat
T9 - T10 Kontaktlinsenlösungen

Bei Thiomersal (Tab. 18) ergaben sich starke Abweichungen, da bei dieser Substanz die eingesetzte Konzentration extrem niedrig ist (0,002%). Thiomersal besitzt überdies von allen untersuchten Konservierungsmitteln die schlechteste Stabilität. Da auch die Abbauprodukte des Thiomersals eine antimikrobielle Eigenwirkung besitzen (78), zeigt die HPLC-Bestimmung durchwegs niedrigere Werte als der Agardiffusionstest.

4. Diskussion

Wie die Überprüfung des Konservierungsmittelgehalts in Fertig-arzneimitteln ergab, kann der Agardiffusionstest als Bestimmungsmethode auch dort eingesetzt werden wo, bedingt durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an Wirkstoff, die HPLC-Methode nicht durchführbar ist.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei vergleichsweiser Durchführung beider Methoden nicht immer übereinstimmende Werte erhalten werden. Die relativen Standardabweichungen des Agardiffusionstests sind für Benzalkoniumchlorid $s_{rel} = 2,45\%$, für Chlorhexidinsalze $s_{rel} = 3,23\%$, für Phenylquecksilbersalze $s_{rel} = 1,62\%$ und für Thiomersal $s_{rel} = 1,06\%$ und liegen somit deutlich über denen der HPLC-Bestimmung mit $s_{rel} = 0,61\%$ für Benzalkoniumchlorid, $s_{rel} = 0,59\%$ für Chlorhexidinsalze, $s_{rel} = 0,64\%$ für Phenylquecksilbersalze sowie $s_{rel} = 0,61\%$ für Thiomersal.

Da bei Thiomersal auch dessen Zersetzungsprodukte antimikrobielle Wirkung aufzeigen, lagen hier die Befunde des Agardiffusionstests um etwa 10-50% höher.

Bei Vergleich des Arbeitsaufwandes beider Methoden lassen sich für die HPLC-Methode folgende Vorteile erkennen:

- Einsatz von Analysenautomaten möglich, dadurch geringerer Zeitaufwand
- kürzere Analysenzeiten
- schnellere Auswertung
- keine langwierigen Vorbereitungen
- genauere Werte, da geringere relative Standardabweichung
- Stabilitätsspezifität

Vergleicht man deklarierte und gefundene Konservierungsmittelkonzentrationen, so fällt auf, daß in Augentropfen mit den Substanzen Chlorhexidin, Phenylquecksilbersalzen und Thiomersal z.T. manifeste Unterdosierungen festgestellt werden.

Die Ausfällung schwerlöslicher anorganischer Salze des Chlorhexidins durch isotonisierende Zusätze bietet in einem Fall die Erklärung für diesen Vorgang. Bei den Phenylquecksilbersalzen dürfte ihre Schwerlöslichkeit, bei Thiomersal seine chemische Instabilität die Ursache sein.

III. Beeinflussung der Stabilität und Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln durch die Herstellung von Augentropfen

Voraussetzung für die antimikrobielle Wirksamkeit von Konservierungsmitteln ist deren Amphiphilie. Dieses physikalisch-chemische Verhalten wirkt sich nicht nur auf die Zellmembranen der Mikroorganismen aus, sondern kann auch Reaktionen mit Bestandteilen der Arzneiform verursachen.

Die Wirkung eines Konservierungsmittels ist jedoch nur dann gesichert, wenn die eingesetzte Substanz in genügend hoher, frei verfügbarer Konzentration in der wäßrigen Phase verbleibt.

Nach Ansetzen der Lösung können ausreichend konservierte Präparate durch folgende Einflüsse Konservierungsmittelverluste erleiden (41):

- Adsorption an Geräte und Sorption an Filtermaterialien bei der Herstellung
- Änderung der antimikrobiellen Wirkung durch Milieueinflüsse
- Umsetzungen mit Wirk- und Hilfsstoffen
- Sorptions- und Permeationsvorgänge bei Behältermaterialien
- Instabilität durch hydrolytischen und oxidativen Abbau

Diese zu einem Mindergehalt an antimikrobieller Substanz führenden Vorgänge wurden bereits von anderen Autoren beschrieben (41 - 44).

Die vorliegenden Untersuchungen versuchen eine im Bereich der Apothekenrezeptur vorhandene Lücke zu schließen.

Die Verarbeitung kleinerer Mengen, der Einsatz von Einmalgeräten sowie das Fehlen breit angelegter Untersuchungsmöglichkeiten kennzeichnen hierbei die Situation des öffentlichen Apothekers. Bei den Konservierungsmitteln für Augentropfen kommt noch hinzu, daß diese aus Verträglichkeitsgründen häufig in sehr niedriger Konzentration eingesetzt werden. Bereits geringe Verluste können dann zu einer Einschränkung der Breite des Wirkungsspektrums oder zu einem Übergang von der Mikrobicidie zur Mikrobistase führen (45).

1. Einfluß von Filtrationsmenge und Filtermaterial auf die Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln bei der Entkeimungsfiltration

Zur Herstellung steriler Augentropfen wird in der Rezeptur die Entkeimungsfiltration herangezogen, wobei häufig vorsterilisierte Einmalfilter verwendet werden.

Konservierungsmittelverluste durch Filtermaterialien spielen bei großen Volumina unter Berücksichtigung eines Vorlaufs praktisch keine Rolle. Eine bisher zu wenig erfolgte Beachtung verdient dieser Vorgang jedoch bei der rezeptur- und defekturemäßigen Herstellung kleinerer Mengen.

Zur Untersuchung der aktuellen Situation von Konservierungsmittelverlusten an Filtermaterialien wurden apothekenübliche Einmalfilter herangezogen (Tab. 19).

Die verwendeten Einmalfilter bestanden entweder aus reinem Celluloseacetat oder aus einem Mischester Celluloseacetat/Cellulosenitrat.

Kenndaten	Einmalfilter		
	Millipore Optex®	Sartorius Minisart® SM16529	Schleicher & Schüll Rotrand® FP 030/3
Filtermaterial	Mischester Celluloseacetat/ Cellulosenitrat	Celluloseacetat	Celluloseacetat
Gehäuse	PVC PP Filtersiebplatte	Cryolite®	Polycarbonat
Porengröße	0,22 µm	0,2 µm	0,2 µm
Filterfläche	3,9 cm²	3,8 cm²	5,7 cm²
Totvolumen	< 0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
Berstdruck	5,2 bar	7 bar	> 10 bar
Betriebsdruck	max 5 bar	6 bar	< 7 bar
Durchflußwert H ₂ O	30 ml min ⁻¹ bei 0,7 bar	100 ml min ⁻¹ bei 1,5 bar	60 ml min ⁻¹ bei 1 bar
Anschlüsse	Luer	Luer	Luer

Tab. 19

Kenndaten der eingesetzten Einmalfilter

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden 10 ml der einzelnen Konservierungsmittellösungen mit einer Glasspritze durch das jeweilige Einmalfilter gedrückt. Ohne Separierung eines Vorlaufs wurden dann die Fraktionen 0-2 ml, 4-6 ml und 8-10 ml aufgefangen und einer Gehaltsbestimmung unterzogen. Die angegebenen Werte errechnen sich als Mittelwert aus vier verschiedenen Filtrationen.

Konservierungsmittel	filt. Volumen	Wiederfindung (% Ausgangswert)		
		Optex®	Minisart®	Rotrand®
Benzylalkohol 1%	0- 2 ml	99,1	90,7	84,8
	4- 6 ml	100,4	98,5	96,0
	8-10 ml	100,4	101,0	101,1
Chlorbutanol 0,5%	0- 2 ml	100,7	96,2	93,7
	4- 6 ml	100,8	100,2	100,4
	8-10 ml	101,5	101,4	100,3
Phenylethanol 0,5%	0- 2 ml	99,4	89,3	86,3
	4- 6 ml	100,1	99,9	96,9
	8-10 ml	100,6	100,5	100,4
Phenoxyethanol 1%	0- 2 ml	86,8	80,4	71,1
	8-10 ml	100,5	100,2	95,0

Tab. 20 Wiederfindungsrate alkoholischer Konservierungsmittel nach Filtration durch verschiedene Einmalfilter (n = 4)

Wie aus Tab. 20 hervorgeht, tritt bei alkoholischen Konservierungsmitteln nur in den ersten beiden Millilitern ein deutlicher Verlust auf. Prozentsätze von etwa 10-15% werden hier an die beiden lipophileren Celluloseacetatfilter gebunden.

Phenoxyethanol weist für alle Filter die höchsten Bindungsraten auf. Hier werden im Falle des Rotrand®-Filters 28,9% des Konservierungsmittels in den ersten beiden Millimetern sorbiert.

Bei Konservierungsmitteln vom Typ der quartären Ammoniumsalze ist eine etwas höhere Sorption an hydrophile Filter des Mischestertyps zu beobachten (Tab. 21).

Konservierungs- mittel	filt. Volumen	Wiederfindung (% Ausgangswert)		
		Optex®	Minisart®	Rotrand®
Benzalkonium- chlorid 0,01%	0- 2 ml	83,1	92,5	88,8
	8-10 ml	98,6	100,5	98,9
Benzethonium- chlorid 0,01%	0- 2 ml	93,9	99,7	100,4
	4- 6 ml	100,6	100,1	100,9
	8-10 ml	100,2	101,2	103,2
Cetalkonium- chlorid 0,01%	0- 2 ml	37,1	48,4	37,4
	4- 6 ml	76,8	85,0	72,3
	8-10 ml	92,4	98,2	97,2
Cetrimonium- bromid 0,1%	0- 2 ml	92,5	96,1	93,7
	4- 6 ml	97,1	99,5	99,2
	8-10 ml	99,6	99,6	100,5
Cetylpyridinium- chlorid 0,01%	0- 2 ml	69,9	88,7	81,2
	8-10 ml	97,5	99,6	97,2

Tab. 21 Wiederfindungsrate von Konservierungsmitteln vom Typ der quartären Ammoniumverbindungen nach Filtration durch verschiedene Einmalfilter (n = 4)

Auch hier sind die Verluste in der Fraktion 0-2 ml erheblich. Diese sind bei Cetalkoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid mit 30-63% am stärksten ausgeprägt. Die restlichen 8 Milliliter werden im allgemeinen wesentlich schwächer sorbiert. Im Falle von Cetalkoniumchlorid 0,01% beträgt jedoch die gebundene Gesamtmenge 62,6% (0-2 ml), 27,7% (4-6 ml) sowie 2,8% (8-10 ml) und stellt damit einen sehr deutlichen, im Grenzbereich des tolerierbaren liegenden Sorptionsverlust dar.

Konservierungs- mittel	filt. Volumen	Wiederfindung (% Ausgangswert)		
		Optex®	Minisart®	Rotrand®
Chlorhexidindi- acetat 0,01%	0- 2 ml	96,5	92,5	89,7
	8-10 ml	99,7	100,5	99,3
Chlorhexidindi- glukonat 0,014%	0- 2 ml	94,6	88,6	82,7
	8-10 ml	97,8	98,1	97,7

Tab. 22 Wiederfindungsrate von Chlorhexidinsalzen nach Filtration durch verschiedene Einmalfilter (n = 4)

Bei den Chlorhexidinsalzen bestehen Unterschiede im Sorptionsverhalten (Tab. 22). Das Glukonat zeigt bei allen Filtertypen eine deutlich höhere prozentuale Gehaltsabnahme. Bei Einsatz des gleichen Salzes kann eine höhere Bindung an die lipophilen Celluloseacetatfilter als an den Mischestertyp beobachtet werden. Von Chlorhexidindiacetat werden im ungünstigsten Fall an Rotrand®-Filter 10,3% (0-2 ml) und 0,7% (8-10 ml) gebunden.

Bei der Sorption an Celluloseesterfilter nehmen Phenylquecksilbersalze eine Sonderstellung ein. Sogar die 8-10 ml Fraktion erbringt Sorptionsverluste zwischen 2-8%, wobei die lipophileren Celluloseacetatfilter höhere Verluste verursachen.

Die anderen quecksilberorganischen Konservierungsmittel zeigen für Thiomersal und Timerfon® praktisch keine, für Cialit® deutlich geringere Verluste. Letzteres wird bei Rotrand®-Filtern zu 15% in der 0-2 ml Fraktion und zu 1,3% in der 8-10 ml Fraktion gebunden.

Konservierungsmittel	filt. Volumen	Wiederfindung (% Ausgangswert)		
		Optex®	Minisart®	Rotrand®
Cialit® 0,01%	0- 2 ml	100,1	93,9	85,0
	8-10 ml	101,4	99,5	98,7
Phenylquecksilberacetat 0,002%	0- 2 ml	87,5		
	4- 6 ml	99,5	86,1	77,6
	8-10 ml	100,9	98,9	97,1
-borat 0,002%	0- 2 ml	81,8	75,0	64,3
	4- 6 ml	92,0		
	8-10 ml	97,9	95,0	91,9
Thiomersal 0,002%	0- 2 ml	99,8	99,8	99,6
	8-10 ml	100,5	100,4	100,8
Timerfon® 0,01%	0- 2 ml	100,7	100,4	100,2
	8-10 ml	100,6	100,3	100,9

Tab. 23 Wiederfindungsrate quecksilberorganischer Konservierungsmittel nach Filtration durch verschiedene Einmalfilter (n = 4)

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß unter den gewählten Bedingungen sowohl die filtrierte Menge als auch der eingesetzte Filtertyp beim Verlust von Konservierungsmitteln zu berücksichtigen sind.

Eine häufig erhebliche Sorption tritt vor allem in den ersten beiden Millilitern des Filtrats auf. Mit ansteigender Filtrationsmenge nimmt die Wiederfindungsrate zu.

Das etwas lipophilere Celluloseacetatfilter hat dabei stärkere Bindungstendenzen für Alkohole sowie für schlecht wasserlösliche Verbindungen. An Filter des etwas hydrophileren Mischestertyps werden tendenziell gut wasserlösliche Konservierungsmittel stärker gebunden.

Auch der Typ des eingesetzten Konservierungsmittels muß berücksichtigt werden. Alkohole und anionische Substanzen werden demnach weniger stark sorbiert als kationische Substanzen.

1.1 Diskussion und Schlußfolgerung

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, führt die Verwendung handelsüblicher Einmalfilter zur Sterilfiltration vor allem in den ersten beiden Millilitern des Filtrats zu einem signifikanten Verlust an Konservierungsmittel. Dieses Ergebnis bestätigen Befunde der Literatur (41, 46).

Obwohl die Verluste häufig nur in den ersten beiden Millilitern auftreten, können sie in bestimmten Fällen, wie einer Filtration von nur 10 ml in der Rezeptur, zu Konservierungsmittelverlusten von mehr als 10% führen.

So wurden beispielsweise bei der Filtration von Phenylquecksilberboratlösung durch einen Filter des Mischestertyps Gehalte von 82% (0-2 ml), 92% (4-6 ml) und 98% (8-10 ml) des Ausgangswerts gefunden. Die Wiederfindungsrate von 109 µg entspricht bei einem Eingangswert von 120 µg einem Herstellungsverlust von praktisch 10%. Bei Filtration der gleichen Substanz durch einen Celluloseacetatfilter von 5,7 cm² Fläche wurden deutlich höhere Verluste beobachtet. Es konnten nur 64% (0-2 ml) und 98% (8-10 ml) ermittelt werden. Dies ergibt eine Wiederfindungsrate von 63 µg bei 80 µg eingesetztem Konservierungsmittel. Damit beträgt hier der herstellungsbedingte Verlust 21%.

Liegt der Verlust von Konservierungsmittel in den ersten beiden Millilitern des Filtrats über 20%, so muß bei ungünstigen Ver-

hältnissen wie Filtrationsmengen von nur 10 ml mit Konservierungsmittelverlusten von mehr als 10% gerechnet werden.

Da mit zunehmender Filtrationsmenge eine steigende Wiederfindungsrate beobachtet wird, kann geschlossen werden, daß nur relativ schwache Wechselwirkungen mit einer begrenzten Bindungskapazität bestehen.

Zwei unterschiedliche Effekte dürften verantwortlich zu machen sein:

Bei den kationischen Substanzen, welche im Gegensatz zu den anionischen Konservierungsmitteln deutlich stärker gebunden wurden, sind Bindungen an die schwach negativen Teilladungen der Celluloseester zu berücksichtigen.

Insbesondere bei den Alkoholen tritt als Wechselwirkung ein "Einlösen" in das lipophile Filtermaterial ein. Wegen der geringen Schichtdicke und der begrenzten Filterfläche stellt sich auch hier bald ein Gleichgewicht ein.

Die Ergebnisse zeigen, daß das lipophilere Celluloseacetat vermehrt mit schwer wasserlöslichen Substanzen und Alkoholen reagiert. Bei Filtern vom Mischestertyp, bei welchen die Lipophilie durch den Cellulosenitratanteil vermindert ist, sind die gut wasserlöslichen Konservierungsmittel stärker gefährdet.

Differenzen der Bindungsrate bei den beiden Celluloseacetatfiltern gehen auf die unterschiedlichen Filterflächen zurück. Deshalb trat in allen Fällen bei dem Filter Rotrand® mit 5,7 cm² Fläche eine höhere Gehaltsabnahme auf, als bei Minisart®-Filtern mit nur 3,8 cm² Fläche.

Das Verhältnis 1:1,5 der beiden Filterflächen entspricht praktisch auch dem Verhältnis der jeweiligen Gehaltsverluste.

Schlußfolgerung für die pharmazeutische Praxis

Nachdem Eckart und Mitarbeiter bei Lokalanästhetika zeigten (48), daß Gehaltsverluste an Filtermaterialien vom Celluloseestertyp durch den pH-Wert erheblich verändert werden können,

lassen sich für die pharmazeutische Praxis folgenden Schlußfolgerungen ableiten:

- Bei jeder Sterilfiltration muß mit Konservierungsmittelverlusten gerechnet werden. Diese sind abhängig vom Typ des Konservierungsmittels, der filtrierten Menge, von der Art des Filtermaterials sowie von der Filterfläche.
- Bei Konservierungsmittelverlusten von mehr als 20% in den ersten beiden Millilitern des Filtrats kann bei Filtration von 10 ml die 90%-Gehaltsgrenze an antimikrobieller Substanz unterschritten werden.
- Beim Einsatz in der Rezeptur von Augentropfen mit Volumina von 10 ml müssen Filter mit möglichst kleiner Filterfläche verwendet werden.
- Für Chlorhexidin- und Phenylquecksilbersalze eignet sich zur Vermeidung von Sorption besser ein Filter vom Mischestertyp, für die quartären Ammoniumverbindungen ein solches aus Celluloseacetat. Bei Thiomersal besteht praktisch keine Abhängigkeit vom Filtermaterial.

2. Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch Hitzesterilisation

Die Sterilisation in gespanntem Wasserdampf gilt als die sicherste Methode zur Entkeimung wäßriger Lösungen. Die dabei auftretende Temperaturbelastung kann sich auch auf die Stabilität von Konservierungsmitteln nachteilig auswirken, da Zersetzungs Vorgänge dadurch erheblich beschleunigt werden.

Untersuchungen über die Gehaltsverluste von Konservierungsmitteln durch Sterilisation in gespanntem Wasserdampf sind bisher nur unzureichend beschrieben worden. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb von Interesse, in welchem Umfang Konservierungsmittel durch Anwendung der Sterilisation in gespanntem Dampf bei 121°C von Gehaltsminderungen betroffen sind.

Zur Abklärung eines möglichen Einflusses der eingesetzten Behältnisse wurden die meisten Konservierungsmittellösungen zu 10 ml in Weißglasampullen der hydrolytischen Klasse I sowie zu 10 ml in Aponorm®-Augentropfenflaschen untersucht. Die Sterilisation der Augentropfenflaschen erfolgte stehend ohne Kontakt der Lösung mit dem Kautschukmaterial der Tropfaufsätze.

Konservierungsmittel	Behältnisse			
	Weißglasampullen		Aponorm®-Augentropfenflaschen	
	110°C/30'	121°C/20'	110°C/30'	121°C/20'
Benzylalkohol	100,8	100,1	99,1	98,6
Chlorphenylethylalkohol	99,7	99,8	-	-
β-Phenylethylalkohol	100,5	99,7	99,8	99,9
Phenoxyethanol	100,8	100,1	91,9	91,4
Benzalkoniumchlorid	100,9	99,4	95,9	94,9
Benzalkon B	99,9	99,8	-	-
Benzethoniumchlorid	100,5	100,4	-	-
Cetalkoniumchlorid	99,9	99,8	-	-
Cetrimoniumbromid	100,6	99,5	-	-
Cetylpyridiniumchlorid	100,6	100,2	99,5	99,0
Cialit®	100,5	99,9	15,6	10,8
Phenylquecksilberacetat	100,6	100,1	90,3	88,6
Phenylquecksilberborat	100,5	100,2	90,4	89,5
Phenylquecksilbernitrat	100,6	100,7	95,7	94,9
Thiomersal	54,9	21,4	69,1	58,2
Timerfon®	100,1	100,7	98,5	97,8
Chlorhexidindiacetat	99,4	99,0	97,9	96,1
Chlorhexidindiglukonat	99,5	99,1	96,5	94,3

Tab. 24 Beeinflussung des Gehalts von Konservierungsmitteln für Augentropfen durch Sterilisation in gespanntem Dampf bei 110°C/30' und 121°C/20' in Weißglasampullen und Aponorm®-Augentropfenflaschen

Nach Zuschmelzen der Ampullen wurden die Lösungen in den beiden Packmitteln einer Sterilisation von 20 Minuten bei 121°C oder

30 Minuten bei 110°C in einem automatisch arbeitenden Autoklaven unterzogen. Nach Beendigung der Autoklavierung und Abkühlung erfolgte eine Überprüfung der Ampullen auf Dichtigkeit im Blaubad. Anschließend wurde eine hochdruckflüssigkeitschromatographische und mikrobiologische Gehaltsbestimmung vorgenommen. Jeder Versuch wurde mit jeweils 4 Gefäßen durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte dieser 4 Bestimmungen dar.

Unter den gegebenen Bedingungen betrug die Ausgleichszeit von 20°C bis 110°C bzw. 120°C etwa 3 Minuten, für die Abkühlzeit von 110°C bzw. 120°C auf 80°C müssen etwa 30 Minuten berücksichtigt werden.

Wie die Befunde zeigen (Tab. 24), erleidet unter den beschriebenen Bedingungen mit Ausnahme von Thiomersal kein Konservierungsmittel einen nennenswerten Gehaltsverlust in zugeschmolzenen Weißglasampullen.

Die Abnahme der Chlorhexidinsalze bleibt mit etwa 1% relativ gering. Infolge der Stabilität der Konservierungsmittellösungen erbrachte eine Verringerung der Temperatur bei gleichzeitiger Verlängerung der Sterilisationszeit keine Vorteile.

Im Gegensatz dazu zeigt eine Sterilisation in Aponorm[®]-Augentropfenflaschen bei allen Substanzen eine unterschiedlich ausgeprägte, signifikante Gehaltsabnahme. Der Verlust kann dabei im Fall von Cialit[®] bis zu etwa 84% bzw. 89% betragen.

Die bei Thiomersal erhaltenen Ergebnisse konnten auch mikrobiologisch bestätigt werden.

Packmittel	Gehalt in % vom Ausgangswert	
	hochdruckflüssigkeits- chromatographisch	mikrobiologisch
Weißglas- ampulle	21,4	86,3
Augentropfen- flasche (Aponorm®)	58,2	94,3

Tab. 25 Gehaltsunterschiede bei der hochdruckflüssigkeitschromatographischen und mikrobiologischen Bestimmung von Thiomersal nach Autoklavierung bei 121°C/20 min

Wie aus Tab. 25 ersichtlich, ist auch mikrobiologisch in Augentropfenflaschen eine geringere Abnahme als in Ampullen zu beobachten. Die Absolutwerte weichen jedoch in Abhängigkeit von der Bestimmungsmethode deutlich voneinander ab. Dies kann damit erklärt werden, daß auch Abbauprodukte von Thiomersal noch antimikrobiell wirksam sind.

2.1 Diskussion und Schlußfolgerung

Die Zersetzung von Thiomersal durch Hitzesterilisation bei 121°C/20' bzw. 110°C/30' steht im Gegensatz zu Angaben der Literatur (36,49) und läßt sich mit den bisher verwendeten zum Teil nicht stabilitätsspezifischen Bestimmungsmethoden erklären. Thiomersal wurde im allgemeinen nach oxidativem Aufschluß oder durch die Dithizonmethode bestimmt. Letztere erfaßt vor allem ohne Anwendung des Reversionsverfahrens speziell das Quecksilber und ist deshalb nicht spezifisch für das Molekül des Thiomersals.

Mikrobiologische Bestimmungen täuschen wegen der mikrobiziden Wirkung von Spaltprodukten des Thiomersals ebenfalls zu hohe Gehalte vor.

Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte HPLC-Methode ermöglicht dagegen eine stabilitätsspezifische Erfassung des Thiomersalmoleküls.

Im Zusammenhang mit der Zersetzlichkeit von Thiomersal sollte deshalb überprüft werden, wieweit eine Deklaration "konserviert mit 0,002% Thiomersal" im Einzelfall haltbar erscheint oder ob damit eine Fehldeklaration vorliegt.

Der Verlust von Konservierungsmitteln während der Sterilisation in Aponorm[®]-Augentropfenflaschen läßt sich auf mehrere Ursachen zurückführen. Augentropfenflaschen ermöglichen nicht wie zugeschmolzene Ampullen einen hermetischen Abschluß. Zu berücksichtigen ist ferner, daß bei Temperaturerhöhung der Ordnungszustand von Plasten und Elasten vermindert wird und das Eindringen von Substanzen erleichtert ist (50). Möglicherweise gelangen auch über die Dampfphase Konservierungsmittelmoleküle vermehrt in Kontakt mit dem Tropfer.

Folgende Punkte sollten als Schlußfolgerung für die Praxis beachtet werden:

- Übliche Augentropfenkonservierungsmittel können mit Ausnahme von Thiomersal hitzesterilisiert werden, wenn nicht Wechselwirkungen mit Wirk- und Hilfsstoffen oder Milieueinflüsse berücksichtigt werden müssen.
- Thiomersal wird bei Anwendung des arzneibuchüblichen Hitze-sterilisationsverfahrens in gespanntem Wasserdampf zersetzt.
- Bei Sterilisation in gespanntem Dampf muß bei Verwendung von Aponorm[®]-Augentropfenflaschen mit Konservierungsmittelverlusten gerechnet werden.

3. Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch Augentropfenbehältnisse und Tropfaufsätze

Behältermaterialien aus Gummi und Kunststoff können zu hohen Verlusten von Konservierungsmitteln führen (51-55).

Durch Bindung an die Oberfläche von Primärpackmitteln tritt dabei Adsorption, bei Bindung in der Tiefe des Materials Absorption ein. Man faßt beide Vorgänge unter dem Begriff "Sorpton" zusammen.

Augen- tropf- flasche	Typ	Flasche	Tropfer	Schraub- teil	Überwurf- kappe	Verschlus- hütchen
1 ◇	Aponorm II Zentrop	Braunglas hydrolyt. Klasse I	Silikon- kautschuk transparent	Poly- propylen	Poly- propylen	---
2 ■	Zentrop neue Aus- führung	Braunglas hydrolyt. Klasse I	Silikon- kautschuk transparent mit Kugel- tropferka- nüle Poly- propylen	Poly- propylen	---	Poly- propylen
3 △	Retro-blau neue Aus- führung	Braunglas hydrolyt. Klasse I	Chlorbutyl- Kautschuk	Poly- propylen	---	Poly- propylen
4 ▲	Stella	Braunglas hydrolyt. Klasse I	Poly- propylen	Poly- propylen	Poly- propylen	---
5 ●	Fa. Raku	Nieder- druck- Polyethy- len + 3% Titan- dioxid	Niederdruck- Polyethylen	---	Hochdruck- Poly- ethylen	---
6 ○	Fa. Raku	Nieder- druck- Polyethy- len natur	Niederdruck- Polyethylen	---	Hochdruck- Poly- ethylen	---
7 □	Retro-rot neue Aus- führung	Braunglas hydrolyt. Klasse I	Naturgummi	Poly- propylen	---	Poly- propylen

Tab. 26 Zusammensetzung der untersuchten Augentropfenflaschen

Permeation, d.h. Diffusion der Substanz durch das Behältermaterial, kann nach der Durchdringung zu Verflüchtigung führen. Chemische Reaktionen mit Bestandteilen der Verpackung können zusätzlich zur Verminderung des verfügbaren Konservierungsmittelanteils führen.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang neue Packmittel sowie für die Rezeptur entwickelte Augentropfenflaschen überprüft werden (Tab. 26).

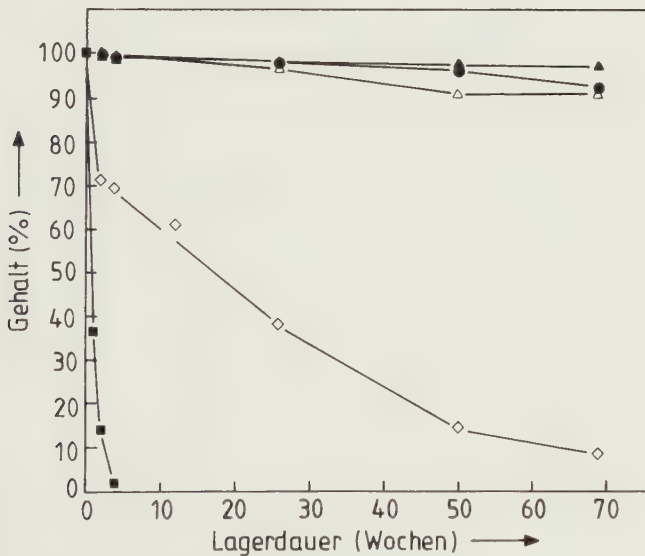


Abb. 17 Gehaltsabnahme von Chlorbutanolösungen (0,5%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n=4)

- ◇- Braunglas mit Tropfer Silikonkautschuk, transparent (Aponorm®)
- Braunglas mit Tropfer Silikonkautschuk, transparent mit Kugeltropferkanüle PP (Zentrop®)
- △- Braunglas mit Tropfer Chlorbutylkautschuk (Retro® blau)
- ▲- Braunglas mit Tropfer PP (Stella®)
- Vollkunststoffgefäß aus ND-PE + 3% TiO₂, weichmacherfrei
- Vollkunststoffgefäß aus ND-PE, natur, weichmacherfrei
- Braunglas mit Tropfer Naturgummi (Retro® rot)

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden wäßrige Konservierungsmittellösungen ohne weitere Hilfsstoffe in die Augentropfenfläschchen abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 20°C im Klimaraum.

Zur Schaffung eines Kontakts zwischen der Untersuchungslösung und dem Tropfer wurden die Fläschchen in umgekehrter Stellung, d.h. auf dem Kopf stehend, gelagert. Nach bestimmten Zeitabständen erfolgte eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Gehaltsbestimmung. In den Abbildungen sind ihre Ergebnisse jeweils als Mittelwert mehrerer Einzelbestimmungen in 4 Augentropfenflaschen dargestellt.

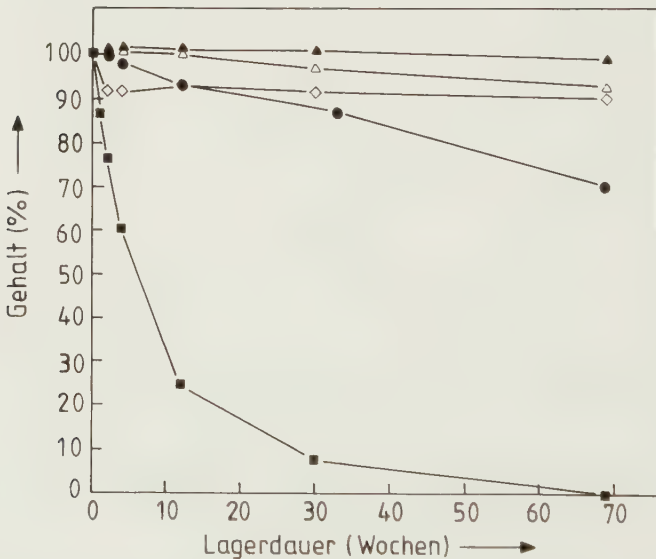


Abb. 18 Gehaltsabnahme von Phenylethanollösungen (0,5%)
in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt
mit den Tropfansätzen (n = 4)
(Symbole siehe Abb. 17)

Besonders starke Verluste erleiden die drei untersuchten alkoholischen Konservierungsmittel durch Silikonkautschuktropfer (Abb. 17-19). Zwischen den beiden damit ausgestatteten Fläsch-

chen zeigen sich jedoch erhebliche Unterschiede. Die Augentropfenflasche mit der Polypropylen-Kugeltropferkanüle führt zu sehr viel höheren Gehaltsabnahmen, welche bei Chlorbutanol in 4 Wochen 100%, bei Phenylethanol in 69 Wochen 100% sowie bei Benzylalkohol nach 12 Wochen 63% betragen.

Polyethylenbehältnisse verursachen verminderte Wiederfindungsraten bei Chlorbutanol und Phenylethanol. Letzteres ist mit Gehaltsverlusten um 30% in 69 Wochen stärker betroffen.

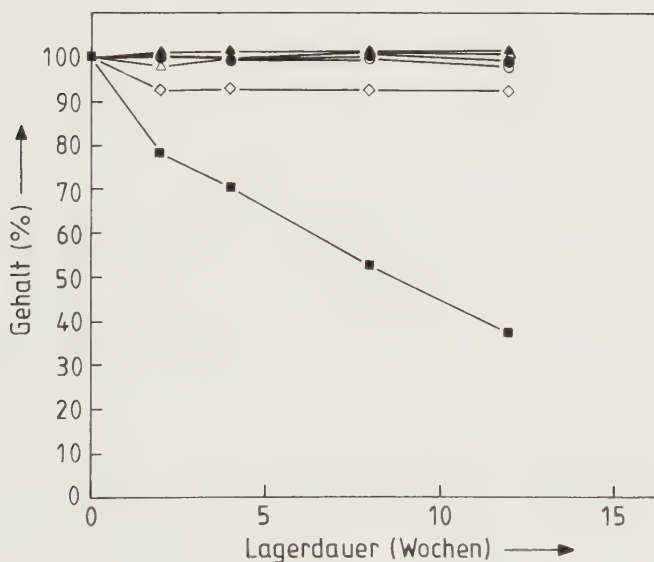


Abb. 19 Gehaltsabnahme von Benzylalkohollösungen (1%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4)
(Symbole siehe Abb. 17)

Schwächere Gehaltsminderungen treten bei beiden Alkoholen auch durch Chlorbutylgummi ein. Nach 69 Wochen können jedoch noch 90% nachgewiesen werden.

Wie aus Abb. 20 hervorgeht, tritt bei Benzalkoniumchloridlösungen eine Gehaltsminderung nur bei Naturkautschuk-Tropfern auf. Durch dieses Material erfolgt eine Gehaltsabnahme von

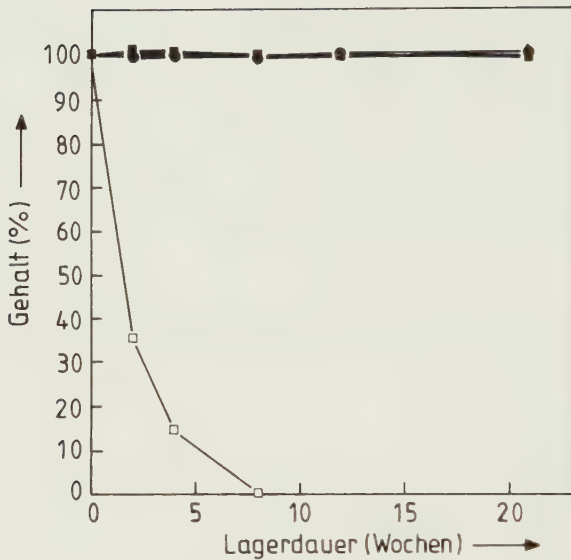


Abb. 20 Gehaltsabnahme von Benzalkoniumchloridlösungen (0,01%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

100% innerhalb von 8 Wochen. Die anderen Materialien verursachen trotz des engen Kontaktes mit der Lösung keine Verfügbarkeitsprobleme.

Die beiden Chlorhexidinsalze (Abb. 21 und 22) zeigen einen vergleichbaren Verlauf der Gehaltsabnahme. Beim Glukonat wird nach etwa 40 Wochen die 90%-Gehaltsgrenze unterschritten. Beim Acetat wurde der 90%-Wert innerhalb eines Jahres noch nicht erreicht.

Phenylquecksilbersalze weisen ebenfalls eine hohe Sorptionsneigung gegenüber Silikonkautschuk auf (Abb. 23-25). Nach 6-7 Wochen läßt sich praktisch kein Konservierungsmittel mehr in der Lösung nachweisen. Dieser Befund wurde durch die Untersuchungen bei den späteren Prüfterminen bestätigt.

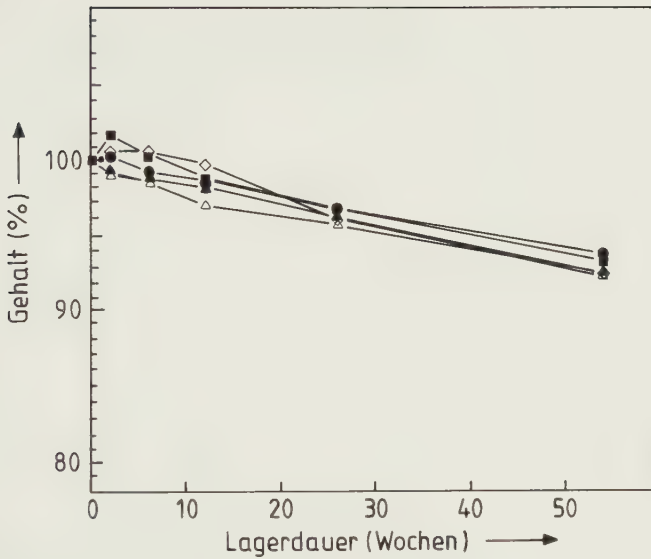


Abb. 21 Gehaltsabnahme von Chlorhexidindiacetatlösungen (0,01%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

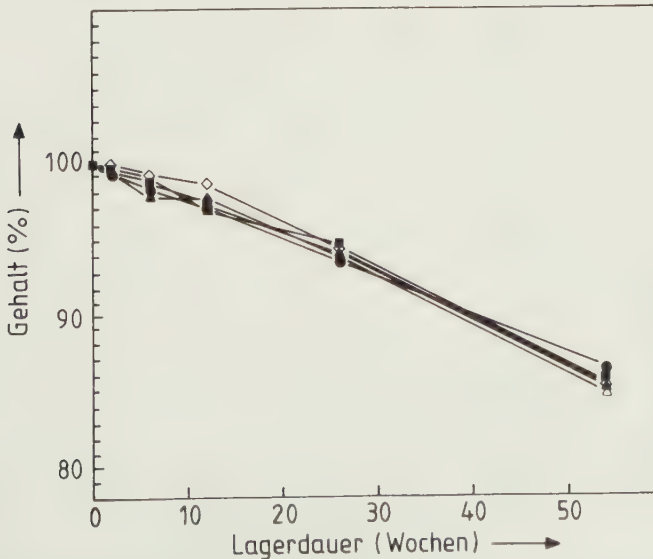


Abb. 22 Gehaltsabnahme von Chlorhexidindigluconatlösungen (0,014%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

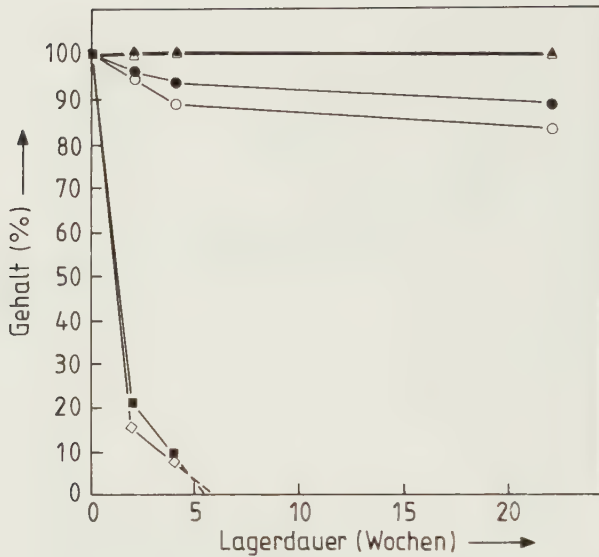


Abb. 23 Gehaltsabnahme von Phenylquecksilberacetatlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

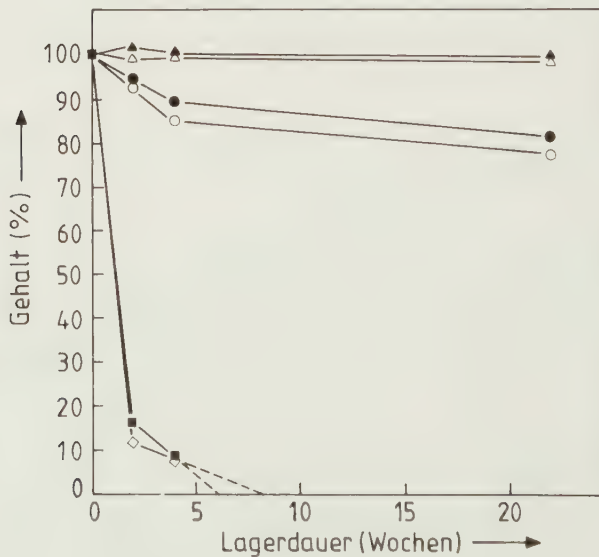


Abb. 24 Gehaltsabnahme von Phenylquecksilberboratlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

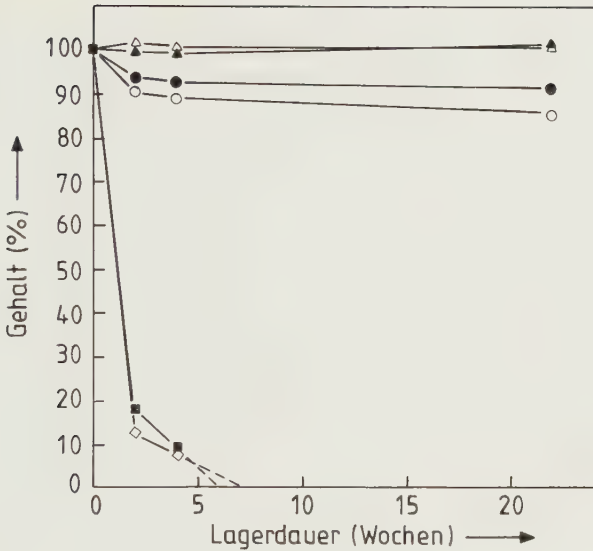


Abb. 25 Gehaltsabnahme von Phenylquecksilbernitratlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

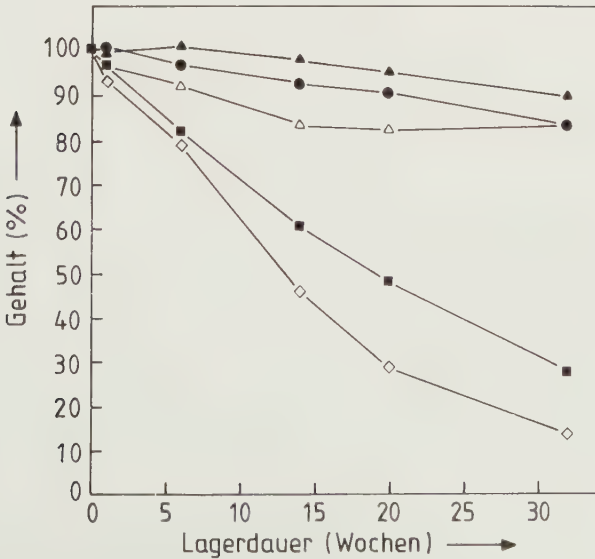


Abb. 26 Gehaltsabnahme von Thiomerallösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenflaschen bei Kontakt mit den Tropfaufsätzen (n = 4) (Symbole siehe Abb. 17)

Eine schwächere Sorptionstendenz zeigen Phenylquecksilbersalze bei Packmitteln mit Polyethylen. Niederdruckpolyethylen mit 3% Titandioxid führt dabei zu etwas geringeren Substanzverlusten als reines Niederdruckpolyethylen. Nach 4 Wochen trat eine annähernde Sättigung ein und der Gehalt nahm im weiteren Verlauf der Untersuchungen kaum noch ab. Die drei Phenylquecksilbersalze verhalten sich praktisch gleich.

Bei Thiomersallösungen (Abb. 26) wurde in allen eingesetzten Augentropfenfläschchen eine Verfügbarkeitsminderung durch physikalische Instabilität beobachtet. Die beiden mit Silikonkautschuktropfern ausgestatteten Behältnisse bewirken eine Gehaltsabnahme bis 13% bzw. 27%. Aber auch Chlorbutylgummi und Polyethylen verursachen Abnahmen der analysierbaren Stoffmenge. Sogar bei den Flaschen mit Polypropylentropftülle wird nach etwa 32 Wochen die 90% Gehaltsgrenze erreicht. Bei diesen Befunden läßt sich jedoch nicht mehr unterscheiden zwischen einem chemischen Abbau von Thiomersal und seiner Sorption an die Behältermaterialien. Es muß wahrscheinlich mit beiden Einflußfaktoren gerechnet werden.

3.1 Diskussion und Schlußfolgerung

Bei einer Beurteilung der vorliegenden Befunde ist zu berücksichtigen, daß die gewählten Versuchsbedingungen extreme Sorptionsbelastungen darstellen, da ein ständiger Kontakt der Konservierungsmittellösung mit den Tropfern gegeben war. Lediglich bei den Kunststoffbehältnissen besteht der Kontakt der Lösung mit dem Plastmaterial auch bei aufrechter Stellung der Fläschchen.

Bei Silikonkautschuk ist wahrscheinlich eine Permeation die Ursache für die starken Verluste der Alkohole. Das unterschiedliche Verhalten der beiden Silikonkautschukbehältnisse kann dabei durch die Konstruktion bedingt sein.

Silikonkautschuk sorbiert lediglich Chlorbutanol in größerem Ausmaß, bei Phenylethanol und Benzylalkohol tritt nach anfänglicher Abnahme um etwa 10% bereits eine Sättigung ein. Bei der

Aponorm®-Flasche verhindert eine Überwurfkappe aus Polypropylen, welche den ganzen Tropfer umschließt, die Verflüchtigung des Alkohols. Wie an den Behältnissen mit Polypropylen-tropfern gezeigt werden konnte, ist Polypropylen weder durchlässig für Alkohole noch sorbiert es diese.

Bei der nur im obersten Teil mit einem Polypropylenverschlußhütchen versehenen Zentrop®-Flasche permeiert der flüchtige Alkohol durch die Tropftülle und verdampft, während weitere Substanz aus der Lösung aufgenommen wird.

Chlorbutylgummi verursacht durch Sorption von Chlorbutanol und Phenylethanol während des ganzen Untersuchungszeitraums eine stetige Gehaltsabnahme, die nach etwa 69 Wochen die 90%-Grenze erreicht.

Von Gehaltsverlusten bedroht sind Alkohole auch in Polyethylenbehältnissen. Damit können im Prinzip Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt werden (56-59).

Ein Verlust von Benzylalkohol konnte nur in der Größenordnung von 3% festgestellt werden. Dies ist auf den kurzen Untersuchungszeitraum von 15 Wochen im Gegenstaz zu 69 Wochen bei Chlorbutanol und Phenylethanol zurückzuführen.

Eine Unterscheidung zwischen Permeation und Sorption ist hier nicht zwingend möglich. Durch Hitzesterilisation werden die Verluste jedoch erheblich vergrößert (60).

Gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten (61) zeigen auch die Ergebnisse der Sorptionsprüfung von Benzalkoniumchlorid.

Die ermittelten Gehaltsabnahmen für Chlorhexidinsalze haben unabhängig vom Packmittel einen nahezu parallelen Verlauf. Dies legt nahe, daß eine Zersetzung der Substanz und nicht eine Sorption dafür verantwortlich ist. Da das Glukonat dabei einen höheren Verlust aufweist würde dies auch durch Befunde der Literatur bestätigt werden (62).

Bei den Quecksilbersalzen wurden zwischen Aponorm®- und Zentrop®-Flaschen Unterschiede beobachtet. Bedingt wird dies durch die Konstruktion der beiden Tropfer. Aufgrund des Polypropylen-Kugeltropfers verfügt die Zentrop®-Flasche über

weniger Sorptionsfläche als das Aponorm®-Packmittel.

Die von JASPERSEN (63) auf den sperrigen Molekülaufbau zurückgeführte geringe Sorption der Phenylquecksilbersalze an Ofefine wird offenbar durch den 3%igen Titandioxidzusatz weiter vermindert, welcher das Einwandern von Phenylquecksilbermolekülen behindert.

Die Gehaltsverluste von Thiomersal in den verschiedenen Packmitteln haben nicht nur physikalische Ursachen. Im HPLC-Chromatogramm der gelagerten Thiomersallösungen treten Veränderungen der Peaks auf, welche chemische Wechselwirkungen mit dem Behältermaterial nahelegen. So sind Abbaureaktionen mit Beschleunigung der Photodegradation, Komplexbildung mit Zink aus Kautschukverschlüssen, Inaktivierungen durch Füllstoffe oder besondere Gasdurchlässigkeit von Plastmaterialien berichtet worden (64-67).

Zur sicheren Abklärung dieser Vorgänge sind weitere Untersuchungen erforderlich. In diese Überlegungen müssen auch die Zusammensetzung des Plastmaterials, die Zuschlagstoffe und die Herstellungsbedingungen des Behälters einbezogen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

- Die geringsten Wechselwirkungen zeigten die untersuchten Konservierungsmittel mit Polypropylen und Chlorbutylkautschuk.
- Für alkoholische Konservierungsmittel erweisen sich Augentropfenflaschen mit Überwurfkappen, welche den ganzen Tropfer umschließen, als günstiger.
- Silikonkautschuk ist als Bestandteil von Augentropfenflaschen für Konservierungsmittel problematisch.
- Bei Thiomersal können neben der physikalischen Bindung spezifische Wechselwirkungen mit den Behältnissen zu Stabilitätsverlusten führen.

4. Beeinflussung der Stabilität von Konservierungsmitteln durch isotonisierende Zusätze

Das DAB 9 schreibt vor, daß Augentropfen mit der Tränenflüssigkeit annähernd isotonisch sein sollen.

Veranlaßt durch analysierte Mindergehalte bei Fertigarzneimitteln und Hinweise aus der Literatur (68,69) sollte die Verfügbarkeit von Augentropfenkonservierungsmitteln in isotonischen Lösungen eingehender untersucht werden.

4.1 Beeinflussung der Stabilität von Chlorhexidinsalzen durch isotonisierende Hilfsstoffe

Trotz der vom DAC 79 vorgeschlagenen, relativ geringen Anwendungskonzentration von 0,01%, ist die Verwendung des Chlorhexidins als Konservierungsmittel für Augentropfen durch die Löslichkeit seiner Salze begrenzt. Die meisten anorganischen Salze des Chlorhexidins, sowie die Base selbst, sind schwer löslich.

Über die Verträglichkeit von Chlorhexidinsalzen mit physiologischer Natriumchloridlösung gibt es sehr unterschiedliche Angaben (68,70,71). Diese reichen von der Verneinung eines Einflusses bis zur Einschränkung der Verwendung unter Vorschlag anderer Hilfsstoffe zur Isotonisierung.

Bei der vorliegenden Untersuchung trat bei der Lagerung von Chlorhexidindiacetat in isotoner Natriumchloridlösung im Kühlschrank bei 4°C nach mehreren Wochen ein feiner Niederschlag auf. Dieser konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie als Chlorhexidindichlorid identifiziert werden (Abb. 27).

Die Unterschiede zwischen beiden IR-Spektren liegen vor allem im Fingerprintbereich und bei Wellenzahlen zwischen $3300\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ sowie $1650\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$.

Die Identität der Ausfällung mit Chlorhexidindichlorid konnte durch Vergleich von Spektren festgestellt werden.

Die 4°C-Aufbewahrung von Chlorhexidindiacetat in 0,9% Natriumchloridlösung führt zu einer Ausfällung als Chlorhexidindi-

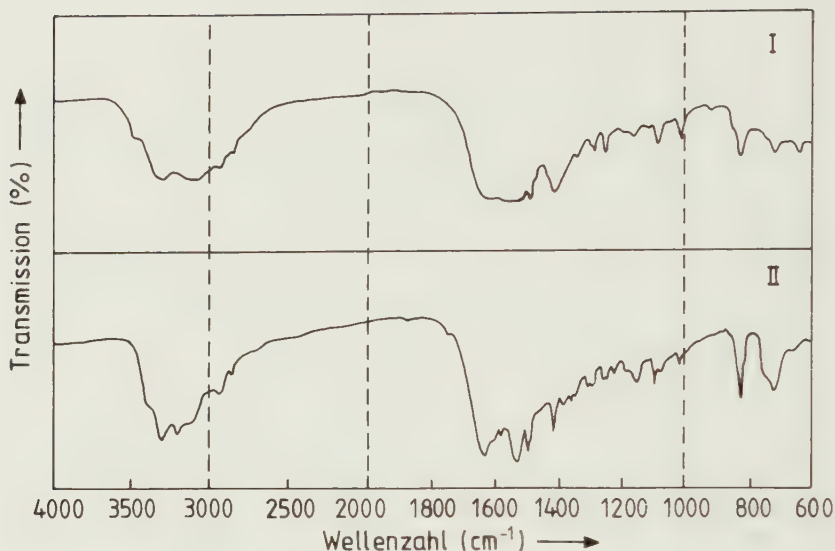


Abb. 27 IR-Spektrum von Chlorhexidindiacetat und Chlorhexidindichlorid

I Chlorhexidindiacetat (Ausgangssubstanz)

II Chlorhexidindichlorid (Niederschlag)

chlorid, welches eine geringere Löslichkeit als das Diacetat aufweist.

Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Autoren gemacht (68, 71), die dann teilweise einen Austausch des Isotonisierungshilfsstoffs vorschlugen.

Da aber auch andere organische Salze des Chlorhexidins geringere Löslichkeiten als das Acetat aufweisen, wurde der Einsatz von anorganischen Elektrolyten zur Isotonisierung von chlorhexidinhaltigen Lösungen näher untersucht.

Zur Durchführung wurden Chlorhexidindiacetat und Chlorhexidindiglukonat in den Konzentrationen von 0,01% bzw. 0,014% in verschiedenen isotonischen Lösungen bei 4°C und 20°C über mehrere Wochen gelagert. Nach verschiedenen Zeitabständen wurden organoleptische Prüfungen auf Ausfällungen sowie eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Gehaltsbestimmung durchgeführt.

Isotonisierender Zusatz	4°C				20°C			
	0	Wochen			0	Wochen		
		5	12	26		5	12	26
NaCl 0,9%	(+)	++	+++	+++	-	-	-	+
KNO ₃ 1,6%	++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++
Borsäure 1,9%	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-
Borsäure-Borax-Puffer pH 7,5	+	+	++	++	+	+	+	++
Phosphat-Puffer pH 7,25	++	++	++	++	++	++	++	++
Natriumacetat 1,3%	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 27 Auswirkungen von isotonisierenden Elektrolyten auf die physikalische Stabilität von Chlorhexidindiacetat

Isotonisierender Zusatz	4°C				20°C			
	0	Wochen			0	Wochen		
		5	12	26		5	12	26
NaCl 0,9%	-	-	-	-	-	-	-	-
KNO ₃ 1,6%	+	+++	+++	+++	(+)	++	++	+++
Borsäure 1,9%	-	-	+	++	-	(+)	(+)	(+)
Borsäure-Borax-Puffer pH 7,5	+	+	+	+	++	++	++	++
Phosphat-Puffer pH 7,25	++	++	++	++	++	++	++	++
Natriumacetat 1,3%	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 28 Auswirkungen von isotonisierenden Elektrolyten auf die physikalische Stabilität von Chlorhexidindigluconat

- kein Niederschlag
- + schwacher Niederschlag
- ++ deutlicher Niederschlag
- +++ starker Niederschlag

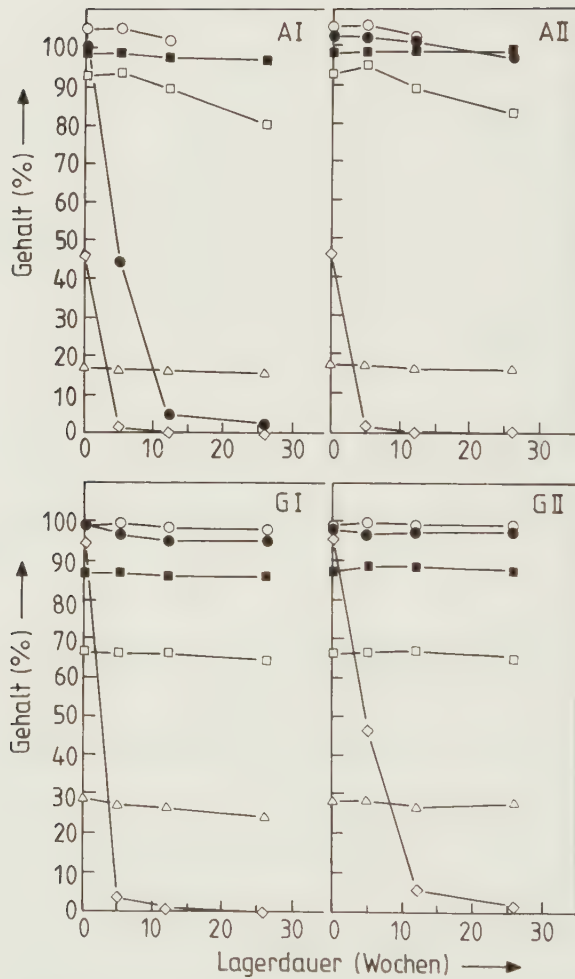


Abb. 28 Auswirkungen von isotonisierenden Elektrolyten auf den Gehalt von Chlorhexidinsalzen (Acetat A, Glukonat G) während der Lagerung bei 4°C (I) und 20°C (II)

- NaCl 0,9%
- ◇- KNO₃ 1,6%
- Borsäure 1,9%
- Borsäure-Borax-Puffer pH 7,5
- △- Phosphat-Puffer pH 7,25
- Natriumacetat 1,3%

Tab. 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der Lagerungsversuche von Chlorhexidinsalzen in verschiedenen isotonischen Elektrolytlösungen. Mit diesen organoleptischen Befunden stimmen die Ergebnisse der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Gehaltsbestimmung, wie sie Abb. 28 darstellt, gut überein.

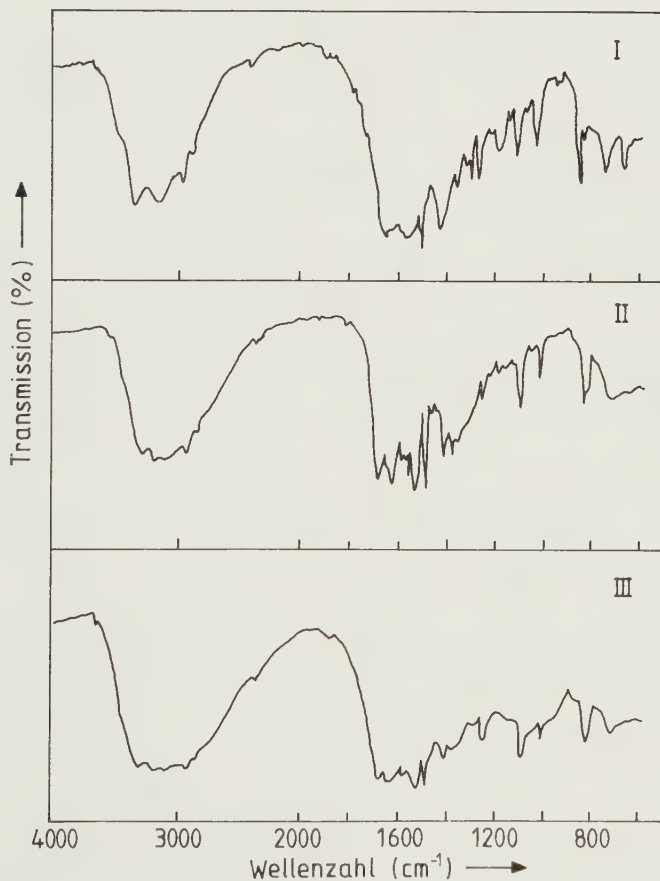


Abb. 29 IR-Spektren von Chlorhexidindiacetat, -nitrat und -phosphat

- I Chlorhexidindiacetat
- II Chlorhexidindinitrat
- III Chlorhexidindiphosphat

Bei Auftreten eines optisch sichtbaren Niederschlags ist gleichzeitig auch eine Verminderung des Chlorhexidingehalts nachweisbar. Gehaltsverluste und Ausfällungen treten temperaturunabhängig bei beiden Salzen mit Kaliumnitrat, Borsäure-Borax-Puffer pH 7,5 und Phosphatpuffer pH 7,25 auf.

Niedrige Temperaturen sind offensichtlich Voraussetzung für das Auftreten von Niederschlägen in physiologischer Kochsalzlösung und isotonischer Borsäurelösung. Hier zeigen sich auch Unterschiede zwischen Acetat und Glukonat. Vorzugsweise trifft man bei ersterem auf eine Wechselwirkung mit Natriumchlorid, bei letzterem auf eine solche mit Borsäure. Der Einsatz von Natriumacetat als isotonisierendem Zusatz erbrachte nur im Gehalt eine geringfügige Änderung. Ein Niederschlag war nicht erkennbar.

Auch die IR-Spektren der Niederschläge in 1,6% Kaliumnitratlösung und in Phosphatpuffer zeigten gegenüber dem Acetatspektrum vor allem im Fingerprintbereich, jedoch auch bei Wellenzahlen von $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ sowie $1500-1400\text{ cm}^{-1}$ Unterschiede.

Bei der HPLC-Bestimmung waren gegenüber der Standardlösung keine neu auftretenden Peaks nachweisbar. Die Gehaltsminderungen der Lösungen wurden allein über die Verkleinerung der Peakfläche ermittelt.

Nach den Ergebnissen der IR- und HPLC-Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Niederschlägen in 1,6% Kaliumnitratlösung und Phosphatpuffer pH 7,25 ebenfalls um schwerlösliche Salze des Chlorhexidins handelt.

4.1.1 Diskussion und Schlußfolgerung

Die Eignung von Chlorhexidinsalzen zur Konservierung von Augentropfen mit Natriumchlorid als isotonisierendem Zusatz wird kontrovers beurteilt. Entstehendes Chlorhexidindichlorid neigt nach der einen Auffassung (71), besonders in Anwesenheit von Fremdstoffen, zur Ausbildung stabiler übersättigter Lösungen. Diese "Stabilität" wird andererseits (68) wegen der Unberechenbarkeit einer Ausscheidung der übersättigten Lösung von Chlorhexidindichlorid bestritten.

Wie die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, muß von einer Verwendung von Chlorhexidinsalzen in Gegenwart von Natriumchlorid dringend abgeraten werden. Dabei bleibt die Problematik nicht nur auf den isotonisierenden Zusatz Natriumchlorid beschränkt. Wie aus Tab. 29 hervorgeht, sind auch eine Reihe anderer anorganischer Salze des Chlorhexidins schwer löslich oder noch schwerer löslich als Chlorhexidindichlorid.

Werden z.B. Kaliumnitrat oder Phosphate zur Isotonisierung verwendet, so kann dies nach unseren Untersuchungen ebenfalls zu einer Abnahme der Chlorhexidinkonzentration führen.

Salz	Löslichkeit in Wasser bei 20°C (% G/V)
Chlorhexidindiacetat	1,80
Chlorhexidindichlorid	0,06
Chlorhexidindifluorid	0,5
Chlorhexidindiglukonat	> 70
Chlorhexidindijodid	0,1
Chlorhexidindinitrat	0,03
Chlorhexidindiperchlorat	0,1
Chlorhexidindiphosphat	0,03
Chlorhexidindisulfat	0,01

Tab. 29 Löslichkeit in % (G/V) von Salzen des Chlorhexidins
in Wasser bei 20°C nach (72)

Früher beobachtete Mindergehalte von Chlorhexidindiglukonat (68,73) können deshalb mit der Bildung schwerlöslicher Salze erklärt werden.

Wie aus Tab. 30 und 31 hervorgeht, kann die Niederschlagsbildung auch nicht durch unterschiedliche Bereitung der Lösungen vermieden werden.

Isotonisierender Zusatz	Chlorhexidindiacetat							
	O-Wert		5 Wochen		12 Wochen		26 Wochen	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
NaCl 0,9%	99,9	100,3	95,9	95,9	22,9	73,5	7,8	46,9
KNO ₃ 1,6%	99,6	100,0	15,8	97,5	2,7	38,4	0	5,4
Borsäure 1,9%	100,1	100,4	98,8	98,6	23,2	81,9	4,8	53,9
Borsäure/Borax-Puffer pH 7,5	91,7	92,7	89,8	83,0	19,8	69,8	0	18,5
Phosphatpuffer pH 7,25	80,7	80,4	19,0	34,3	3,8	25,4	0	11,3
Natriumacetat 1,3%	94,8	95,1	95,0	89,4	92,5	88,3	93,4	87,9
	Chlorhexidindiglukonat							
	O-Wert		5 Wochen		12 Wochen		26 Wochen	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
NaCl 0,9%	102,6	102,8	102,1	101,9	101,3	101,6	100,9	100,9
KNO ₃ 1,6%	109,8	109,6	5,1	6,6	1,7	2,9	0	0
Borsäure 1,9%	106,2	105,8	105,8	104,8	104,9	106,4	105,5	106,2
Borsäure/Borax-Puffer pH 7,5	95,8	96,8	69,0	67,2	83,2	84,9	26,9	34,8
Phosphatpuffer pH 7,25	100,7	100,5	19,9	34,6	18,6	34,8	14,7	32,7
Natriumacetat 1,3%	103,2	103,4	102,3	103,3	103,0	102,3	102,8	101,9

Tab. 30 Gehalt (%) von Chlorhexidinsalzen in isotonischen Lösungen verschiedener Elektrolyte während der Lagerung bei 4°C und 20°C (Zutropfen des Konservierungsmittels aus einer wäßrigen Stammlösung)

Wird, wie in Tab. 31 geschehen, das Konservierungsmittel als Festsubstanz in die isotonische Elektrolytlösung gegeben, treten die Ausfällungen teilweise spontan auf. Bei Mischung einer wäßrigen Konservierungsmittel-Stammlösung mit den jeweiligen

isotonischen Lösungen (Tab. 30) wird hingegen die Auskristallisation der schwerlöslichen Salze verzögert. Die Niederschlagsbildung läßt sich durch die Herstellungsmethode jedoch nicht verhindern.

Isotonisierender Zusatz	Chlorhexidindiacetat							
	0-Wert		5 Wochen		12 Wochen		26 Wochen	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
NaCl 0,9%	102,7	102,8	44,6	102,4	4,8	100,8	2,3	96,8
KNO ₃ 1,6%	45,9	46,2	1,5	1,5	0	0	0	0
Borsäure 1,9%	98,8	98,2	98,9	98,6	97,6	98,8	97,2	98,4
Borsäure/Borax-Puffer pH 7,5	92,8	92,7	93,9	95,1	89,4	89,1	80,2	82,2
Phosphatpuffer pH 7,25	17,0	17,4	16,4	17,1	16,0	16,1	15,2	15,9
Natriumacetat 1,3%	105,0	105,14	105,1	105,1	102,5	102,5	---	---
	Chlorhexidindiglukonat							
	0-Wert		5 Wochen		12 Wochen		26 Wochen	
	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C
NaCl 0,9%	99,4	98,1	96,9	96,9	95,3	97,5	95,3	97,2
KNO ₃ 1,6%	94,7	95,6	3,6	46,3	0,9	5,5	0	1,2
Borsäure 1,9%	87,0	87,6	86,9	88,6	86,1	88,6	86,2	87,1
Borsäure/Borax-Puffer pH 7,5	66,6	66,2	66,0	66,5	66,1	66,8	64,3	64,9
Phosphatpuffer pH 7,25	28,9	28,3	27,2	28,3	26,3	26,6	24,3	27,6
Natriumacetat 1,3%	99,1	99,1	99,5	99,7	98,5	99,0	98,2	98,8

Tab. 31 Gehalt (%) von Chlorhexidinsalzen in isotonischen Lösungen verschiedener Elektrolyte während der Lagerung bei 4°C und 20°C (Einwiegen des Konservierungsmittels als Festsubstanz)

Temperaturerniedrigung läßt die gebildeten schwerlöslichen Salze aus ihren übersättigten Lösungen rascher ausfallen.

Unterschiede zeigen sich im Verhalten der beiden Chlorhexidinsalze. Bei unseren Untersuchungen reagierte das Glukonat nicht mit Natriumchlorid. Über gleiche Befunde berichtete auch FÜRST (71).

Bei Einsatz beider Salze verbessert Chlorhexidindiglukonat oberhalb seiner kritischen Mizellbildungskonzentration die Löslichkeit von Chlorhexidindiacetat (74).

Das Ausfallen schwerlöslicher Salze des Chlorhexidins kann durch Zusatz bestimmter Stoffe verhindert oder verzögert werden. So kann ein Zusatz von 2% Hydroxyethylcellulose bzw. Polyvinylalkohol die Auskristallisation vermeiden (71). Auch Wirkstoffe sind hierfür geeignet, wie im Falle einer Silbernitrat-Chlorhexidin-Zubereitung gezeigt werden konnte (75).

Die geringsten Gehaltsverluste von Chlorhexidin waren in isotonischer Natriumacetatlösung festzustellen. Eine Verwendung dieser Substanz als Isotonisierungsmittel ist jedoch wegen ihrer alkalischen Reaktion wenig wahrscheinlich, zumal die Zersetzung des Chlorhexidins im alkalischen Milieu beschleunigt abläuft (62).

Als Schlußfolgerungen für die pharmazeutische Praxis läßt sich zusammenfassen:

- Die in Augentropfen zur Isotonisierung verwendeten anorganischen Salze können mit Chlorhexidinverbindungen Niederschläge bilden. Dieser Vorgang tritt stets bei Phosphaten, Kaliumnitrat und Borax-Borsäure-Puffer auf. Bei Natriumchlorid und Borsäure muß mit seinem Auftreten gerechnet werden. Wegen der Unsicherheit möglicherweise auftretender Ausfällungen ist vom Einsatz von Chlorhexidinsalzen in Gegenwart solchermaßen isotonisierter Lösungen abzuraten.
- Die Niederschlagsbildung ist temperaturabhängig und wird durch tiefe Temperaturen begünstigt. Chlorhexidinhaltige Lösungen, welche die aufgeführten Isotonisierungszusätze enthalten, sollten nur bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.
- In Rezepturen sollte Chlorhexidindiglukonat in Form einer wäßrigen Stammlösung eingesetzt werden. Diese Rezepturen sind nicht länger als die vom Arzneibuch vorgeschlagene Aufbrauchsfrist zu benutzen und bei Raumtemperatur zu lagern.
- Andere Bestandteile von Formulierungen können die Auskristallisation verhindern. Chlorhexidinsalze müssen deshalb

auf ihre Eignung als Konservierungsmittel mit einem längeren Lagerungstest auf ihre physikalische und chemische Stabilität untersucht werden.

- Soweit in offizinellen Vorschriftensammlungen, beispielsweise im DAC 79, die Kombinationen von Chlorhexidinsalzen mit Isotonisierungsmitteln wie Borsäure, Borax, Natriumphosphaten sowie Natriumchlorid als unbedenklich empfohlen werden, sollten diese Angaben revidiert werden.

4.2 Beeinflussung der Stabilität von Thiomersal durch isotonisierende Zusätze

Bei Thiomersal wird in der Literatur insbesondere über Unverträglichkeiten mit Jodiden berichtet (76,77).

Nach anderen Angaben wird die chemische Zersetzung von Thiomersal jedoch auch durch den isotonisierenden Zusatz Natriumchlorid begünstigt (69).

Zur Abklärung des Stabilitätsverhaltens von Thiomersal wurde dieses in einer Konzentration von 0,002% in Wasser, physiologischer Kochsalzlösung sowie in isotonischer Borsäure- und Natriumacetatlösung nach Lagerung bei 4°C und 20°C untersucht.

Isotonisierender Zusatz	4°C			20°C		
	Wochen			Wochen		
	0	2	4	0	2	4
H ₂ O	100,71	99,9	99,5	100,71	99,2	98,8
NaCl 0,9%	98,9	36,5	11,2	99,4	15,3	0
Borsäure 1,9%	97,3	96,7	95,4	97,4	95,8	89,0
Natriumacetat 1,3%	100,2	98,7	99,1	99,8	98,9	98,4

Tab. 32 Chemische Instabilität von Thiomersal 0,002% unter dem Einfluß isotonisierender Elektrolyte bei 4°C und 20°C Lagerungstemperatur

Während des gesamten Versuchszeitraums trat keine erkennbare Niederschlagsbildung auf. Die in Tab. 32 dargestellten Gehaltsverluste wurden durch hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung ermittelt.

Bei 20°C konnte in 0,9%iger Natriumchloridlösung mit der HPLC nach 4 Wochen praktisch kein intaktes Thiomersal mehr nachgewiesen werden. Bei 4°C waren nur noch etwa 10% des Ausgangsgehalts feststellbar. Im Chromatogramm traten jedoch, wie aus Abb. 30 ersichtlich ist, weitere Peaks als Zersetzungsprodukte auf.

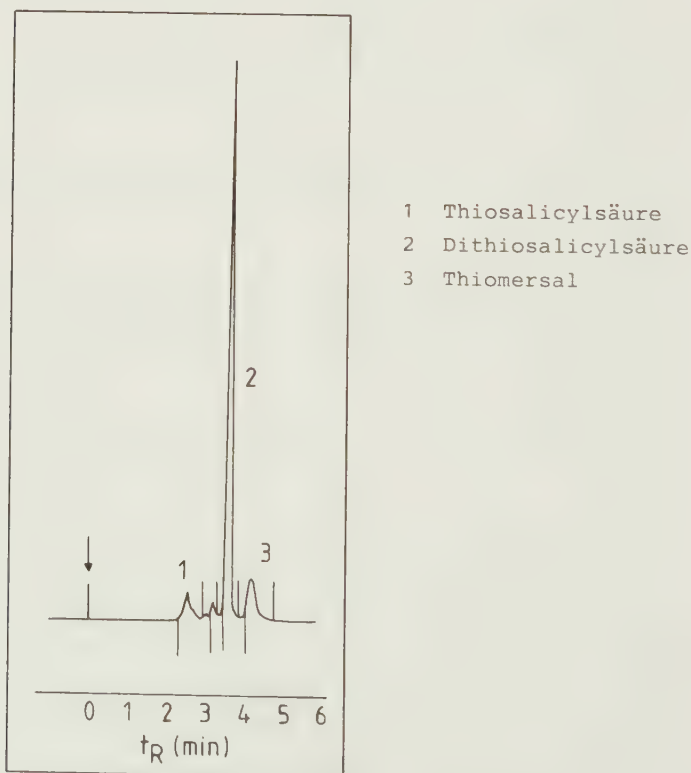


Abb. 30 Zersetzungspeaks im Chromatogramm von Thiomersal 0,002% in physiologischer Kochsalzlösung nach 4-wöchiger Lagerung bei 4°C

Zwei dieser Peaks konnten aufgrund ihrer Retentionszeiten als Thiosalicylsäure und Dithiosalicylsäure identifiziert werden.

Nach Lagerung von Thiomersal in rein wäßriger Lösung traten die gleichen Gehaltsverluste von etwa 1,2-1,6% auf wie bei Aufbewahrung in isotonischer Natriumacetatlösung.

Etwas höhere Verluste waren in isotonischer Borsäurelösung zu beobachten. Nach 4 Wochen wurde bei 20°C die 90%-Grenze gerade unterschritten.

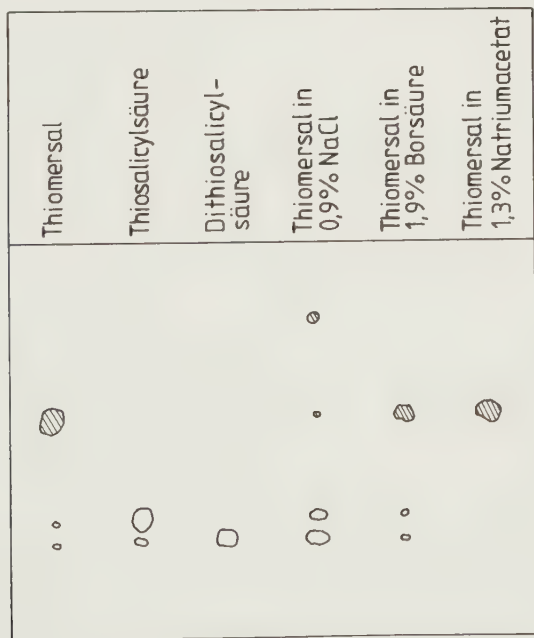


Abb. 31 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Zersetzungsprodukte von Thiomersal in isotonischen Lösungen mit Natriumchlorid, Borsäure und Natriumacetat (schraffierte Flecke: Anfärbung mit Dithizon möglich)

Zur Bestärkung dieser Ergebnisse wurde eine dünnschichtchromatographische Überprüfung vorgenommen.

Wie aus Abb. 31 ersichtlich ist, tritt bei Aufbewahrung in isotonischer Natriumacetatlösung nur ein Fleck auf. Dieser zeigt den gleichen Rf-Wert wie Thiomersal und läßt sich mit Dithizon anfärben.

Bei Lagerung in 0,9%iger Natriumchloridlösung und 1,9%iger Borsäurelösung sind neben dem Thiomersal noch weitere Punkte erkennbar. Sie lassen sich mit Dithizon nicht anfärben und weisen annähernd gleiche Rf-Werte wie Thiosalicylsäure und Dithiosalicylsäure auf.

Damit läßt sich praktisch nachweisen, daß Natriumchlorid mit Thiomersal unter Zersetzung zu Thiosalicylsäure und Dithiosalicylsäure ebenso reagiert, wie dies als Reaktion mit Jodiden bereits beschrieben wurde (69,76,77).

4.2.1 Diskussion und Schlußfolgerung

Wie bereits berichtet wurde (69,76,77), können durch Einwirkung von Halogenidionen reversible und irreversible Reaktionen des Thiomersals auftreten. Einen besonderen Einfluß scheinen danach Jodidionen auszuüben, während Chloride und Bromide als erheblich langsamer reagierend beschrieben werden (78). In einer kinetischen Studie wurde angegeben, daß Chlorid innerhalb eines Jahres einen Verlust der ursprünglichen Thiomersalmenge von mehr als 50% bewirkt (69).

Nach unseren Untersuchungen verläuft der Abbau von Thiomersal in Anwesenheit von Chloridionen weit schneller als bisher angenommen.

Nach STOCK bzw. LÜDTKE tritt bei Thiomersal durch Jodidionen sofort eine Komplexierung am Quecksilberatom ein (78,81). Der Jodo-Komplex kann dann unter geeigneten Bedingungen weiterreagieren. Thiomersal zerfällt offenbar in Thiosalicylsäure und Ethylquecksilberhydroxid. Thiosalicylsäure wiederum wandelt sich in Dithiosalicylsäure um (78,81,83). Ethylquecksilber zerfällt unter Lichteinfluß in Quecksilber(II)-jodid (81,82). Durch HOWORKA wurde darauf hingewiesen, daß diese Reaktion im

Fälle der Chloride und Bromide reversibel verläuft, wenn die Halogenide mit Silbersalzen entfernt werden (76,77).

Der Einfluß des Chlorids in einer isotonischen Natriumchloridlösung könnte möglicherweise folgender sein: Im Gleichgewichtssystem Thiomersal, Thiosalicylsäure und Ethylquecksilberhydroxid entfernt es letzteres durch Bildung von Ethylquecksilberchlorid. Dieses reagiert weiter zum Quecksilber(II)-chlorid.

Durch Bildung von Dithiosalicylsäure aus Thiosalicylsäure wird ein anderer, zur Rückreaktion zum Thiomersal nötiger Partner entfernt. Beide Vorgänge verschieben das Gleichgewicht immer weiter auf die Seite der Zersetzungsprodukte.

Ursache für die Unterschiede zwischen unseren Untersuchungsergebnissen und denen früherer Arbeiten sind möglicherweise die angewandten Analyseverfahren. Die HPLC-Analytik ermöglicht wesentlich genauere Angaben über den Thiomersalverlust und etwaige Abbauprodukte als der oxidative Aufschluß oder die nur halbspezifische Dithizonmethode. Diese erfaßt nicht nur Thiomersal, sondern auch seine quecksilberhaltigen Abbauprodukte.

Die antimikrobielle Wirkung von Thiomersal wird durch eine analytisch feststellbare Zersetzung offenbar nicht beeinträchtigt (84). So konnte für Thiomersal in Kaliumjodid-Augentropfen mit Hilfe eines Konservierungsmittelbelastungstests nachgewiesen werden, daß auch die zersetzte Substanz antimikrobiell wirksam ist (78).

Die von uns durchgeführte mikrobiologische Gehaltsbestimmung mittels Agardiffusionstest erbrachte gegenüber den mit der HPLC erhaltenen Befunden höhere Thiomersalgehalte.

Die Spaltungsvorgänge von Alkylquecksilberhalogeniden unter dem Einfluß von Säuren werden als Protodemercurierung beschrieben (79). Ferner wurde festgestellt, daß saure Spaltungsreaktionen von Organoquecksilberverbindungen durch Halogenidionen katalysiert werden (80).

Eine im Säuren stattfindende Protodemercurierung erklärt die Gehaltsminderung in isotonischer Borsäurelösung. In 1,3% Natriumacetatlösung tritt aufgrund des neutralen bzw. schwach alkalischen pH-Wertes nur eine sehr geringe Zersetzung des Konservierungsmittels auf.

IV. Stabilität und Dosierungsgenauigkeit von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei der Herstellung von Augentropfen

Wäßrige Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen müssen nach Vorschrift des DAB 9 und anderer maßgebender Arzneibücher mit geeigneten Konservierungsmitteln versetzt sein. Deren Konzentration ist sehr gering und liegt bei den vom DAC 79 vorgeschlagenen Substanzen im Bereich von 0,1 mg/ml für Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidinsalze sowie von 0,02 mg/ml für Organomercurysilberverbindungen.

Weiter fordert das Arzneibuch eine Mengenbegrenzung von Augentropfen in Mehrdosenbehältnissen auf 10 ml.

Aufgrund beider Forderungen ist bei der rezepturmäßigen Herstellung von Augentropfen die Einwaage der geringen Konservierungsmittelmengen häufig problematisch.

In der Praxis wird dies dadurch zu beheben versucht, daß Konservierungsmittel tropfenweise aus Stammlösungen dosiert werden.

Bisher sind jedoch weder Untersuchungen zur Stabilität noch solche zur Dosierungsgenauigkeit solcher Stammlösungen bekannt geworden.

1. Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen

Die für die Dosierung von Konservierungsmitteln verwendeten Stammlösungen werden üblicherweise auf Vorrat hergestellt, um bei Bedarf laufend zur Verfügung zu stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Stabilität solcher Stammlösungen untersucht werden.

Die in Tab. 33 aufgeführten Stammlösungen wurden dazu in wäßriger Form hergestellt, in Glas- bzw. Kunststoff-Flaschen abgefüllt und bei verschiedenen Temperaturen gelagert. Nach bestimmten Belastungszeiten wurden Proben gezogen und hochdruck-flüssigkeitschromatographisch bestimmt.

Konservierungsmittel Stammlösung	Konzentration (%)
Benzalkoniumchlorid	0,487
Chlorhexidindiacetat	0,55
Phenylquecksilberborat	0,1
Thiomersal	0,1
Benzylalkohol	1
Chlorbutanol	0,5
Phenylethanol	0,5

Tab. 33 Art und Konzentration der untersuchten Stammlösungen

Die Gehalte wurden dabei so festgelegt, daß jeweils 4 Tropfen dieser Stammlösungen auf 10,0 g Augentropfenlösung die vom DAC 79 vorgeschriebene Konzentration an Konservierungsmittel ergaben. Bei Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidindiacetat führte deren Grenzflächenaktivität zu veränderten Tropfgewichten, die bei Benzalkoniumchlorid eine Anwendung von 8 Tropfen der eingesetzten Stammlösung erforderlich machten. Bei Chlorhexidindiacetat war eine geringfügige Konzentrationserhöhung auf 0,55% ausreichend.

Benzylalkohol, Chlorbutanol und Phenylethanol sind schlecht wasserlöslich. Dies kann dazu führen, daß solche Lösungen in anwendungsüblichen Konzentrationen bereits vorrätig gehalten und direkt ohne Tropfdosierung zur Bereitung von Augentropfen verwendet werden. Sie wurden deshalb in dieser Konzentration in die Untersuchung einbezogen.

Da die Untersuchung in ungepufferten, wässriger Lösung erfolgte, war eine reaktionskinetische Auswertungsmöglichkeit fraglich. Die Einlagerungen wurden trotzdem auch bei erhöhten Temperaturen vorgenommen, um durch Streßbedingungen die Temperaturabhängigkeit der Stabilitätseigenschaften zu erfassen.

1.1 Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei Lagerung in Glasflaschen

Bei der Lagerung von Konservierungsmittel-Stammlösungen in Glasflaschen waren bemerkenswerte Stabilitätsunterschiede nachweisbar.

Benzalkoniumchlorid (Tab. 57) zeigte nach 21 Wochen und Phenylquecksilberborat (Tab. 58) nach 22 Wochen auch bei Lagerung von 70°C keine signifikante Gehaltsabnahme.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)					
	0	1	2	4	8	12
20°C	100,6	101,1	100,6	100,1	100,0	100,4
30°C	100,6	100,7	100,1	100,4	100,3	100,2
40°C	100,6	101,0	99,9	100,6	100,0	100,4
50°C	100,6	101,1	100,1	100,0	99,7	100,3
60°C	100,6	100,6	100,3	99,9	99,5	99,1
70°C	100,6	100,7	100,5	99,8	98,7	98,3

Tab. 34 Stabilität einer 1%, wäßrigen, ungepufferten Benzylalkohollösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

Ein wesentlich anderes Stabilitätsverhalten wurde hingegen für alkoholische Konservierungsmittel beobachtet. Bei den drei untersuchten Substanzen läßt sich eine zunehmende Instabilität von Benzylalkohol über Phenylethanol zu Chlorbutanol erkennen.

Benzylalkohol (Tab. 34) erfährt nach 12 Wochen bei 70°C einen Gehaltsverlust von 1,7%, Phenylethanol (Tab. 35) nach 13 Wochen und 70°C einen solchen von 6%.

Chlorbutanol (Tab. 36) hingegen hat bei 70°C und 12 Wochen Belastungsdauer bereits um 60% abgenommen. Verfolgt man seinen Gehaltsverlauf bei dieser Temperatur weiter, so fanden sich nach 24 Wochen nur noch etwas über 5% und nach 66 Wochen läßt sich keine intakte Substanz mehr nachweisen.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)					
	0	2	4	13	30	69
20°C	100,15	100,11	99,97	99,61	99,51	99,42
30°C	100,02	100,98	99,98	99,63	99,59	99,61
40°C	100,21	99,95	99,84	98,86	98,63	98,20
50°C	100,15	99,8	99,25	97,32	96,2	92,97
60°C	100,08	98,2	-	95,96	92,08	81,99
70°C	100,12	98,98	-	94,0	85,32	67,49

Tab. 35 Stabilität einer 0,5%, wäßrigen, ungepufferten Phenylethanollösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

Mit dieser Gehaltsabnahme tritt zugleich eine deutliche Abnahme des pH-Wertes ein. Sie erreicht bei 66-wöchiger Lagerung bei 70°C einen Wert von 4,7, bei 50°C einen von 4,3 und bei 20°C einen solchen von 2 pH-Einheiten.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)					
	0	2	4	12	24	66
20°C	100,82	100,75	100,48	99,65	99,27	98,27
40°C	100,85	100,11	98,98	96,79	93,50	73,46
50°C	100,78	100,32	98,38	91,69	85,04	58,0
60°C	100,92	94,49	88,05	68,19	37,92	5,03
70°C	100,83	79,73	74,69	40,06	5,27	-

Tab. 36 Stabilität einer 0,5%, wäßrigen, ungepufferten Chlorbutanollösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

Keine unzersetzte Substanz konnte nach 52 Wochen Belastungsdauer bei 70°C bei Chlorhexidindiacetat (Tab. 37) gefunden werden. Nach 24 Wochen waren bei dieser Streßtemperatur noch 19% Substanz vorhanden. Dies belegt die größere Stabilität von Chlorhexidindiacetat gegenüber Chlorbutanol.

Als instabilste Substanz erweist sich Thiomersal (Tab. 38). Hier liegen bei 20°C binnen 13 Wochen nur noch 94,6% des Ausgangsgehalts vor. Die Instabilität bei erhöhten Temperaturen ist dementsprechend ausgeprägter.

Wird für die Lagerung einer Thiomersal-Stammlösung eine durchschnittliche Raumtemperatur von 25°C gewählt, so wird nach einem Zeitraum von etwa 13 Wochen die 90%-Grenze unterschritten.

Die geringsten Verluste wurden erwartungsgemäß bei einer Lagerung im Kühlschrank bei 4°C ermittelt und liegen nach 13 Wochen bei etwa 0,3%.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)					
	0	4	8	12	24	52
20°C	100,10	100,01	100,11	100,24	100,88	100,02
30°C	99,95	100,18	100,08	99,98	99,55	98,90
40°C	99,90	100,32	98,70	98,31	95,14	90,19
50°C	100,05	98,91	93,46	90,42	80,37	52,56
60°C	100,12	94,86	84,12	73,97	40,81	8,61
70°C	100,18	71,64	50,27	41,96	19,04	-

Tab. 37 Stabilität einer 0,55%, wäßrigen, ungepufferten Chlorhexidindiacetat-Stammlösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)					
	0	1	2	5	7	13
4°C	100,71	100,3	100,50	100,02	100,02	99,67
20°C	100,65	100,5	99,61	98,61	96,60	94,57
30°C	100,75	100,54	96,56	95,22	93,80	87,01
40°C	100,53	98,47	95,39	90,07	82,24	75,04
50°C	100,62	96,83	89,31	72,04	67,63	56,33
60°C	100,68	94,32	84,51	63,68	54,86	45,36
70°C	100,78	90,05	77,51	53,25	47,18	30,07

Tab. 38 Stabilität einer 0,1%, wäßrigen, ungepufferten Thiomersal-Stammlösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

1.2 Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei Lagerung in Polyethylenflaschen

Als gänzlich ungeeignet zur Aufbewahrung von Konservierungsmittel-Stammlösungen erweisen sich Hochdruckpolyethylen-Flaschen. Erfolgt die Lagerung der Konservierungsmittel-Stammlösungen in diesen, so ist bei allen untersuchten Konservierungsmitteln mit einer Gehaltsveränderung zu rechnen. Diese nimmt mit steigender Temperatur stark zu, kann jedoch nicht nur mit einer chemischen Zersetzung erklärt werden, da physikalische Instabilität durch Sorption hinzukommt und dadurch Folgereaktionen ausgelöst werden können. So treten auch bei Benzalkoniumchlorid und Phenylquecksilberborat, welche in Glasflaschen stabil waren, Veränderungen auf.

Wie aus Tab. 39 ersichtlich ist, entsteht bei Benzalkoniumchlorid bei höheren Temperaturen eine scheinbare Gehaltszunahme. Die Polyethylenflaschen zeigten dabei während des Versuchszeitraums bei erhöhter Temperatur deutliche Erweichungen und Formveränderungen.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)						
	0	1	2	4	8	12	21
20°C	100,63	99,97	99,93	100,05	100,47	100,95	101,38
30°C	100,59	100,48	100,64	100,97	100,98	100,85	101,54
40°C	100,67	100,32	101,38	102,13	102,24	101,98	102,28
50°C	100,64	100,47	100,96	102,75	106,16	113,84	132,95
60°C	100,58	100,68	104,63	108,50	117,47	136,8	141,70
70°C	100,63	100,16	106,73	132,34	137,34	143,68	153,84

Tab. 39 Stabilität einer 0,487%, wäßrigen, ungepufferten Benzalkoniumchlorid-Stammlösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

Das grenzflächenaktive Benzalkoniumchlorid hatte zugleich die Permeabilität des Kunststoffes für Wasserdampf verändert und durch diese Leckage eine Konzentrierung der Lösung bewirkt.

Bei alkoholischen Konservierungsmitteln (Abb. 32, 33 und 34) treten in Kunststoff-Flaschen die größten Verluste auf. Diese nehmen in der Reihenfolge Benzylalkohol < Phenylethanol < Chlorbutanol zu und führen bei 50°C bei Phenylethanol in 69 Wochen und bei Chlorbutanol im Zeitraum zwischen 24 und 66 Wochen zum 100%igen Gehaltsverlust.

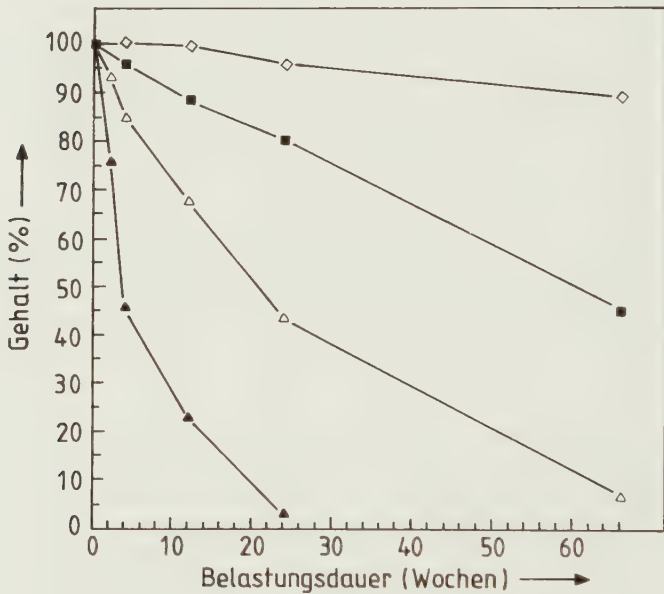


Abb. 32 Stabilität einer 0,5%, wäßrigen, ungepufferten Chlorbutanollösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von Belastungsdauer und -temperatur

—◇— 20°C
—■— 30°C

—△— 40°C
—▲— 50°C

Bei Chlorbutanol (Abb. 32) genügt bereits eine 66-wöchige Lagerung bei 20°C, um die 90%-Gehaltsgrenze zu unterschreiten.

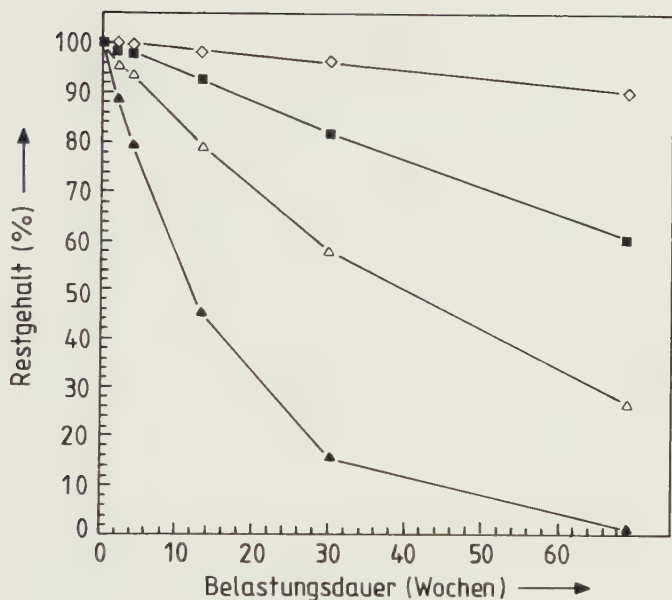


Abb. 33 Stabilität einer 0,5%, wäßrigen, ungepufferten Phenylethanollösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

—◇— 20°C

—△— 40°C

—■— 30°C

—▲— 50°C

Benzylalkohol (Abb. 34) wurde auch bei Temperaturen von 60°C und 70°C gelagert. Ein Verlust von > 10% tritt bei 40°C nach 3 Monaten auf; bei einer 60°C-Lagerung über den gleichen Zeitraum konnten 42%, bei 70°C-Lagerung 16,3% wiedergefunden werden.

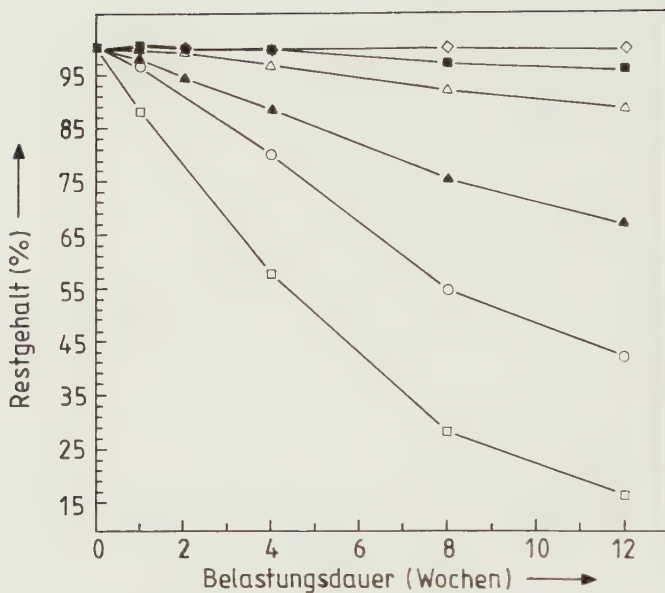


Abb. 34 Stabilität einer 1%, wäßrigen, ungepufferten Benzylalkohollösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von der Belastungsdauer und -temperatur

-◇-	20°C	-▲-	50°C
-■-	30°C	-○-	60°C
-△-	40°C	-□-	70°C

Eine Gehaltsminderung von etwa 7% wurde bei Thiomersal (Abb. 35) bereits nach einer 13-wöchigen Lagerung in Weich-Polyethylen bei 20°C festgestellt. Eine Temperaturerhöhung auf 30°C steigerte diese auf 24%, eine solche auf 40°C auf 34%.

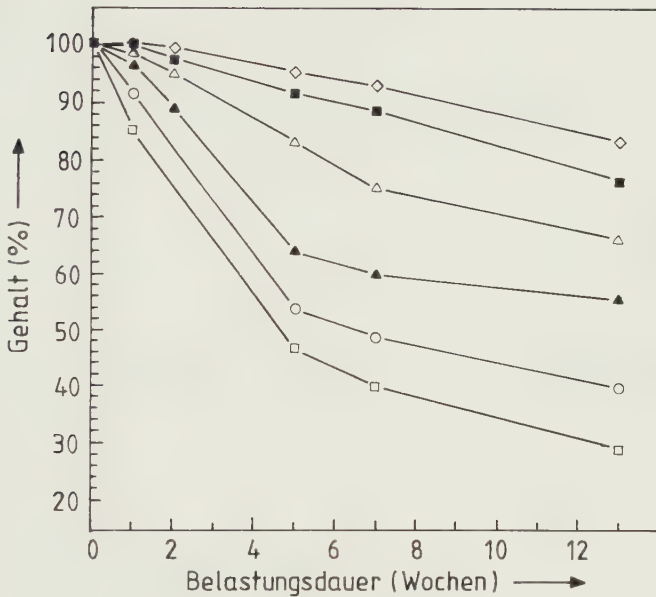


Abb. 35 Stabilität einer 0,1%, wäßrigen, ungepufferten Thiomersal-Stammlösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von Belastungsdauer und -temperatur

-◇-	20°C	-▲-	50°C
-■-	30°C	-○-	60°C
-△-	40°C	-□-	70°C

Phenylquecksilberborat (Abb. 36) unterschreitet erst bei einer 22-wöchigen Lagerung bei 60°C in den eingesetzten Kunststoff-Flaschen die 90%-Grenze und verfügt so über die geringsten Gehaltsverluste bei Lagerung in Hochdruckpolyethylen-Behältnissen.

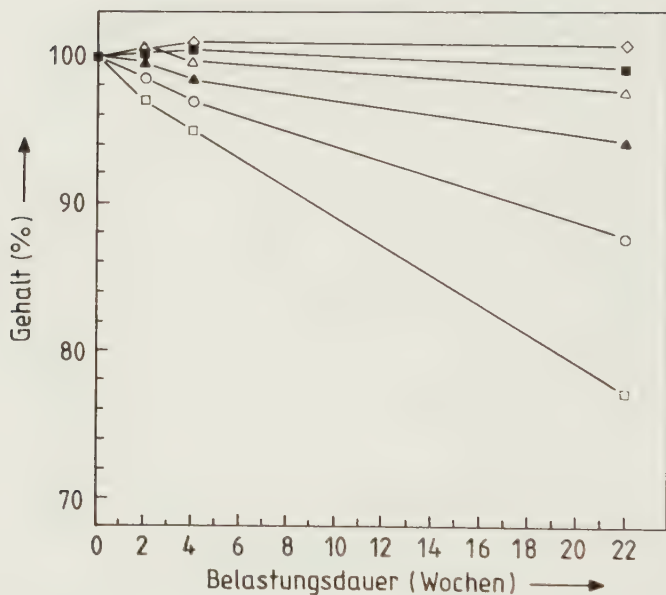


Abb. 36 Stabilität einer 0,1%, wäßrigen, ungepufferten Phenylquecksilberborat-Stammlösung in Hochdruckpolyethylen-Flaschen in Abhängigkeit von Belastungsdauer und -temperatur

-◇- 20°C

-■- 30°C

-△- 40°C

-▲- 50°C

-○- 60°C

-□- 70°C

2. Dosierungsgenauigkeit von Konservierungsmittel-Stammlösungen

Für die Dosierung von Konservierungsmittel-Stammlösungen besitzt die Auswahl des eingesetzten Tropfgeräts und die Herstellungsqualität der Stammlösung entsprechende Bedeutung.

Zur Tropfdosierung eignet sich der Normaltropfenzähler des Arzneibuchs. Dabei muß dessen Form nicht der im Arzneibuch vorgeschlagenen entsprechen, da alle Geräte zugelassen sind, welche die Anforderung des Arzneibuchs erfüllen (85).

Bei Verwendung einer anderen Tropfvorrichtung muß berücksichtigt werden, daß andere Tropfgeräte nur selten für 20 Tropfen Wasser bei 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) ein Gewicht von 1000 mg (± 50 mg) ergeben.

Tropfgerät	s_{rel} (%)
Normaltropfenzähler (Arzneibuchform)	2,84
Normaltropfenzähler (freie Form)	2,76
Pipettenflasche	10,96
Tropfpipette, Glas	14,32
Aponorm®-Augentropfflasche	3,96

Tab. 40 Relative Standardabweichung des Tropfgewichts von 20 Tropfen Wasser in Abhängigkeit vom Tropfgerät ($n = 15$)

Die relative Standardabweichung beim Vergleich von 15 Pipettenflaschen betrug fast 11%, wohingegen hierfür maximal 7,5% als gerechtfertigt gelten (86).

Tropfpipetten aus Glas zeigen mit mehr als 14% s_{rel} die schlechtesten Werte. Aponorm®-Augentropfenflaschen entsprechen hingegen der Anforderung mit einer relativen Standardabweichung <5%.

Bei der Herstellung der Stammlösungen der vier Konservierungsmittel mußte die Grenzflächenaktivität von Benzalkoniumchlorid

und Chlorhexidindiacetat berücksichtigt werden, da sie zu veränderten Tropfgewichten führt.

Konservierungsmittel	Konz.Stamm-lösung (%)	Anzahl Tropfen		erzielte Konservierungsmittel-Konzentration
		für Tropfgewicht von 1000 mg	für Dosierung Konservierungsmittel	
Benzalkoniumchlorid	0,487	39	8	1 mg/10 ml
Chlorhexidin-diacetat	0,55	22	4	1 mg/10 ml
Phenylquecksilberacetat	0,1	20	4	0,2 mg/10 ml
Thiomersal	0,1	20	4	0,2 mg/10 ml

Tab. 41 Angaben zu den hergestellten Konservierungsmittel-Stammlösungen

Aus den Stammlösungen wurden mit Hilfe von Normaltropfenzählern reine Konservierungsmittellösungen von 10,0 g Gewicht in augentropfenüblicher Konzentration hergestellt und deren Gehalt bestimmt.

Tropfgerät	Benzalkoniumchlorid	Chlorhexidin-diacetat	Phenylquecksilberacetat	Thiomersal
Normaltropfenzähler (freie Form)	7,35%	5,81%	3,82%	4,0%
Normaltropfenzähler (Arzneibuchform)	7,64%	5,53%	3,94%	4,2%

Tab. 42 Relative Standardabweichungen der Gehalte von Konservierungsmitteln nach Tropfdosierung aus Stammlösungen (n = 15)

Wie aus Tab. 42 hervorgeht, erreicht die relative Standardabweichung von Benzalkoniumchlorid mit >7% die höchste Streuung. Bei Chlorhexidindiacetat resultieren Werte zwischen 5,5 und 6%, bei den Organoquecksilberverbindungen betrugen sie etwa 4%.

Um die Dosierungsgenauigkeit auch unter Praxisbedingungen zu erfassen, wurden von 10 Versuchspersonen Konservierungsmittellösungen hergestellt und Gehaltsbestimmungen vorgenommen. Als Tropfgerät diente ein von allen Personen^x benutzter arzneibuchkonformer Normaltropfenzähler.

Versuchs- ansatz	Thiomersal	
	Konzentration Stammlösung (mg/10 ml)	ermittelte Konzentration (mg/10 ml)
1	9,97	0,19
2	10,82	0,21
3	10,37	0,20
4	11,41	0,22
5	8,65	0,16
6	10,52	0,22
7	9,84	0,17
8	10,62	0,19
9	9,79	0,18
10	9,56	0,19
n=10	s _{rel} =5,8%	s _{rel} =10,38%

Tab. 43 Gehalte von Stammlösungen und Konservierungsmittellösungen von Thiomersal bei Dosierung durch verschiedene Versuchspersonen^x

Wie aus Tab. 43 hervorgeht, wurde für Thiomersal unter den gewählten Versuchsbedingungen eine relative Standardabweichung von 10,4% nachgewiesen. Mit begrenzten Unterdosierungen (Lösung 5, 7 und 9) sowie Überdosierung (Lösung 4 und 6) muß jedoch in der Anwendungspraxis gerechnet werden.

^xBei den Versuchspersonen handelt es sich um Pharmaziestudenten des 6. Semesters.

Bei Benzalkoniumchloridlösungen können, bedingt durch die Grenzflächenaktivität, zusätzliche Dosierungsprobleme auftreten.

3. Diskussion

Wie aus den vorliegenden Ergebnissen hervorgeht, sind nicht alle Konservierungsmittel-Stammlösungen längerfristig lagerfähig.

Benzalkoniumchlorid und Phenylquecksilberborat zeigten auch bei einer Streßtemperatur von 70°C keine Gehaltsabnahme bei einer Lagerdauer von 21 bzw. 22 Wochen. Ihre Aufbewahrung in Glasflaschen über einen längeren Zeitraum ist möglich.

Stammlösungen mit alkoholischen Konservierungsmitteln besitzen, vor allem in Form von chlorbutanolhaltigen Lösungen, nur eine begrenzte Lagerfähigkeit.

Chlorbutanol unterliegt in wäßriger Lösung einer hydroxylionen-katalysierten, hydrolytischen Zersetzung unter Bildung von Kohlenmonoxid, Salzsäure, Aceton und Spuren von α -Hydroxybuttersäure (14,15,87-89). Durch das Zersetzungsprodukt Salzsäure tritt bei ungepufferten Lösungen eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich auf. Damit verbunden ist eine Verlangsamung der Zersetzungsgeschwindigkeit (14,15,88,89), da die Substanz ihr Stabilitätsoptimum im sauren Bereich besitzt.

Lagerzeit in Wochen	Temperatur				
	20°C	40°C	50°C	60°C	70°C
0	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9
2	5,6	3,8	3,0	2,5	1,9
4	5,0	3,6	2,7	1,9	1,8
12	4,5	3,1	2,4	1,6	1,4
24	4,3	2,8	2,0	1,5	1,3
66	3,9	2,4	1,6	1,3	1,2

Tab. 44 pH-Werte einer wäßrigen Chlorbutanollösung (0,5%) in Abhängigkeit von Lagerdauer und -temperatur

Wie unsere Untersuchungen ergaben, besitzen Benzylalkohol und Phenylethanol eine weitaus höhere Stabilität als Chlorbutanol. Dies bestätigen auch Befunde der Literatur (90,91).

Über begrenzte Haltbarkeit verfügt auch eine Chlorhexidindiacetat-Stammlösung, da binnen eines Jahres bei 40°C die 90%-Gehaltsgrenze erreicht wird.

Die Substanz zersetzt sich dabei unter Bildung von toxischem p-Chloranilin (18,19,92,93). Die Arzneibücher (2. AB-DDR, DAC 79) begrenzen den Gehalt an p-Chloranilin in Chlorhexidinsalzen auf 500 ppm (= 0,05%), wobei diese Anforderung an die Substanz auf deren Reinheit im Zusammenhang mit Nebenprodukten hinzielt.

p-Chloranilin, welches als Reaktionspartner bei der Synthese der Chlorhexidinsalze benötigt wird (94), stellt ein fettlösliches Gift dar, welches Haut- und Augenreizungen, Methämoglobinämie und Nierenschädigungen hervorzurufen vermag (95).

Die Thiomersal-Stammlösung besitzt die geringste Haltbarkeit. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann eine Lagerung bei Raumtemperatur nur höchstens 3 Monate erfolgen. Nach diesem Zeitpunkt wird in einer solchen Stammlösung die 90%-Gehaltsgrenze unterschritten.

Die Zersetzung verläuft dabei unter Bildung von Thiosalicylsäure, Dithiosalicylsäure und Ethylquecksilberhydroxid und wird durch Licht (6,96), Sauerstoff (67) und Hilfsstoffe (69,81) beschleunigt.

Da Thiomersal in der Anlage des DAC 79 am häufigsten zur Konservierung von Augentropfen vorgeschlagen wird, sollte die geringe Stabilität dieser Verbindung künftig stärker bei Neuformulierungen berücksichtigt werden.

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, sind für die Lagerung der Konservierungsmittel-Stammlösungen Kunststoff-Flaschen aus Weichpolyethylen völlig ungeeignet.

In diesen werden Lagerungsverluste bei allen untersuchten Konservierungsmitteln beobachtet. Ursache hierfür sind neben Sorption (Benzalkoniumchlorid, Phenylquecksilberborat) auch

Permeation (Chlorbutanol, Phenylethanol, Benzylalkohol) und die Durchlässigkeit für Sauerstoff (Thiomersal).

Damit können für eine Lagerung von Konservierungsmittel-Stammlösungen in Braunglasflaschen bei Raumtemperatur drei Gruppen unterschieden werden:

Die stabilste Gruppe umfaßt Benzalkoniumchlorid, Phenylquecksilberborat sowie die Alkohole Phenylethanol und Benzylalkohol. Die Stammlösungen dieser Substanzen sind im allgemeinen bei Raumtemperatur 1 Jahr lagerfähig. Nach einem Jahr sollte eine Gehaltsüberprüfung vorgenommen oder die Lösung verworfen werden.

In der zweiten Gruppe finden sich Chlorbutanol und Chlorhexidindiacetat. Ihre Stammlösungen sollten grundsätzlich nach Jahresfrist neu bereitet werden, da die 90%-Grenze unterschritten sein kann.

Die instabilste Gruppe bildet lediglich Thiomersal, als am häufigsten empfohlenes Rezeptur-Konservierungsmittel. Seine Stammlösungen müssen alle 3 Monate frisch hergestellt werden.

Schwierigkeiten bei einer sachgerechten Dosierung der Stammlösungen können bedingt sein durch ungeeignete Tropfer, falsche Handhabung (86,97,98) sowie mangelnde Berücksichtigung der Grenzflächenaktivität von Benzalkoniumchlorid (86,99).

V. Untersuchungen zur Frage der Haltbarkeit von Augentropfen während der Anwendung

Augenarzneimittel, insbesondere wäßrige Augentropfen, zählen zu den besonders instabilen Arzneimitteln.

Dies geht schon daraus hervor, daß viele dieser Fertigarzneimittel mit einem Verfalldatum versehen sein müssen, d.h. weniger als 3 Jahre haltbar sind.

Besondere Probleme ergeben sich mit den bei Augenarzneimitteln besonders häufigen instabilen Wirkstoffen wie Salzen des Adrenalins, Pilocarpins, Physostigmins, Atropins oder Homatropins sowie bei Carbachol, Procain und anderen Lokalanästhetika vom Typ der p-substituierten Benzoessäurederivate.

Auch die Konservierungsmittel in Ophthalmika sind häufig instabil. Problematisch ist dabei, daß die Konservierungsmittel verträglichkeitshalber oft in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen und dadurch besonders gefährdet sind.

Spezielle Stabilitätsprobleme bei wäßrigen Augentropfen in den üblichen Mehrdosenbehältnissen bestehen darin, daß auch Veränderungen nach Anbruch während der mehrwöchigen Zeitspanne ihrer Anwendung auftreten können.

Zur Stabilisierung zugesetzte Inertgase werden frei und teilweise durch Sauerstoff ersetzt, welcher hintangehaltene Oxidationsreaktionen ermöglicht. Durch liegende Lagerung der Fläschchen oder den zur Anwendung notwendigen Tropfvorgang kommen Wirk- und Hilfsstoffe mehrfach täglich mit Gummotropfern in Berührung und werden so sorbiert.

Auch die mit der Bindung von Konservierungsmitteln bei Gebrauch zunehmenden Rekontaminationsmöglichkeiten der sterilen Augentropfen während des Anwendungszeitraums sind dann zu berücksichtigen.

Diesen Imponderabilien trägt das DAB 8 in seiner Monographie "Augentropfen" Rechnung, indem es vorschreibt: "Auf Mehrdosenbehältnissen muß ein Hinweis angebracht sein, daß die Zubereitung höchstens einen Monat lang verwendet werden darf." Auch

andere Arzneibücher legen derartige Aufbrauchfristen fest: so bestimmt die Ph. Helv. VI "Behälter für wäßrige Augentropfen (nicht Augenwässer), die mehrere Dosen enthalten, sind mit der Aufschrift zu versehen: "Nach Anbruch nicht länger als 1 Monat zu verwenden", das ÖAB schreibt vor: "Sie sollten vom Patienten nicht länger als 1 Monat verwendet werden", die BP 1980 fordert "The label on more than one occasion states that the contents should not be used for more than one month after the date on which the container is first opened"; auch das 2. AB-DDR erhebt gleiche Forderungen.

Diese Maßnahme der einmonatigen Verbrauchsfrist nach Anbruch hat allerdings präventiven Charakter und ist ungeachtet der mikrobiologischen Probleme gerade für die chemische Stabilität von Wirkstoff zu Wirkstoff anders zu bewerten.

Die Einführung der Einmonatsfrist nach Anbruch in das DAB 8 hatte insbesondere bei Augenärzten häufig Protest und Vorbehalte bewirkt (100,101).

Nach den Argumenten der Augenärzte ist diese Frist zu kurz, um ein vollständiges Aufbrauchen von Mehrdosenbehältnissen zu gewährleisten.

Die zweite Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs weicht dieser Problematik dadurch aus, indem sie die Frage der Verwendungsdauer nach Anbruch in das Ermessen der nationalen Behörden stellt.

Die Vorschrift hierzu lautet: "The labelling complies with the relevant national legislation and international agreements. The label on the container states in particular: for multidose containers the period after opening the container after which the contents must not be used".

In Wahrnehmung dieser Möglichkeit verlängerte das DAB 9 diese Aufbrauchfrist von 4 auf 6 Wochen.

Zur Frage der Berechtigung dieser Monatsfrist liegen jedoch gegenwärtig fast keine veröffentlichten Befunde vor, die als Entscheidungshilfe für Fragen der chemischen Stabilität instabiler Wirkstoffe sowie der physikalischen Stabilität (Sorption) von Konservierungsmitteln dienen können.

Es erschien deshalb als besonders dringend, anhand von experimentellen Befunden objektive Anhaltspunkte zur Frage des erforderlichen Aufbrauchzeitraums zu erhalten. Als Wirkstoff diente hierzu das instabile Adrenalin. Berücksichtigt wurden auch die ebenfalls durch Instabilität über Sorptionsmöglichkeiten gefährdeten Konservierungsmittel.

Die vorgenommenen Untersuchungen befassen sich ausschließlich mit der physikalisch-chemischen Stabilität der Substanzen. Mikrobiologische Fragen werden nicht behandelt.

Bei der Wahl der Versuchsbedingungen mußte die praktische Gebrauchssituation besonders berücksichtigt werden:

Fertigarzneimittel wurden in ihrer Originalverpackung belassen. Andere zu prüfende Lösungen wurden in handelsüblichen Packmitteln untersucht. Alle Präparate und Zubereitungen wurden bei 20°C im Klimaraum aufrecht stehend gelagert.

Soweit nichts anderes vorgeschrieben, wurden nach Ermittlung eines Eingangsgehaltes 3x täglich 2 Tropfen in senkrechter Stellung abgetropft und in 14-tägigen Abständen Gehaltsbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind jeweils Mittelwerte von vier unabhängig voneinander gelagerten, behandelten und bestimmten Einzelpräparaten.

1. Stabilität von Adrenalin-Präparaten während der Anwendung

Adrenalin ist ein in der Augenheilkunde eingesetztes Sympathomimetikum mit direkter Wirkung auf Alpha- und Beta-Rezeptoren. Der Zersetzungsmechanismus des Adrenalins ist häufig untersucht worden, wobei verschiedene Schritte nur hypothetisch angenommen wurden (102 - 104).

Unter dem Einfluß von Luftsauerstoff und Licht wird Adrenalin über das Adrenalin-o-chinon zum rotgefärbten Adrenochrom oxidiert, welches über Umlagerung zu leuko-oxo-Adrenochrom umgesetzt wird. Die nachfolgende Bildung weiterer Zersetzungsprodukte führt unter Autopolymerisation bis zu braun-schwarz gefärbten melaninartigen Stoffen. Klinische Untersuchungen (105 - 107) ergeben, daß oxidiertes Adrenalin die Ursache für

Melaninablagerungen in Cornea und Conjunktiva, Blockaden im Tränen-Nasen-Kanal sowie für vermehrte Irritationen am Auge sein kann. Die Oxidation des Adrenalins hebt seine pharmazeutische Wirkung weitgehend auf, da diese den Erhalt der phenolischen Hydroxylgruppen voraussetzt.

Die mögliche Racemisierung der verwendeten l-Form des Adrenalins ist in stark sauren Lösungen spezifisch wasserstoffionen-katalysiert. Bis zu einem pH-Wert von 2,5 ist eine schnelle Umlagerung unter Bildung von optisch inaktivem d-Adrenalin zu beobachten.

Diese kann jedoch bei höheren pH-Werten bis etwa pH 6 praktisch vernachlässigt werden. So ist im gesamten, für ophthalmische Adrenalin-Lösungen hauptsächlich in Frage kommenden pH-Bereich von pH 3,0 bis 6,0 kein signifikanter Wirkungsverlust durch Racemisierung zu erwarten (108, 109).

In die vorliegende Untersuchung zur Stabilität von Adrenalin-Zubereitungen während der Anwendung wurden Fertigarzneimittel sowie Rezepturen aus Pharmakopoen und Vorschriftensammlungen einbezogen. Von den untersuchten Fertigarzneimitteln lagen 3 als Monopräparate und 2 als Kombinationspräparate mit Pilocarpin vor.

Wie aus Tab. 46 ersichtlich, wurden 4 Adrenalin-Rezepturzubereitungen ausgewählt. Aufgrund ihres pH-Wertes sind 2 als neutrale, die beiden anderen als saure Adrenalinlösungen zu bezeichnen.

Bei allen Fertigarzneimitteln wurde ein Eingangswert bei Anbruch ermittelt.

Wie die Ergebnisse dieser Gehaltsbestimmung zeigen (Tab. 45), besaßen alle Zubereitungen einen Gehalt von >90%. Zwei Drittel der Präparate wiesen bei Gehaltswerten von >100% Stabilitätszuschläge auf. Legt man den 90-115%-Bereich der "Epinephrin-Injektion" der USP XXI zugrunde, so überschreitet lediglich ein Präparat den oberen Grenzwert um 4,7%.

Präparat	pH-Wert	Lagerungshinweis	Hilfsstoffe	gefundener Gehalt % des deklarierten	Konservierungsmittel
A 1%	7,4	nicht über 20°C vor Lichteinfall schützen nicht umfüllen nicht mit anderen Lösungen mischen	Borsäure	119,7 (Pipettenflasche) 111,1 (mit Tropfaufsatz)	Benzalkoniumchlorid
1%	2,9	vor Hitze und Licht schützen	Natrium- edetat	109,4	Benzalkoniumchlorid
B 2%	2,9	nicht länger als nötig offen stehen lassen, Deckel gut verschließen		103,3	
C 1%	6,2	gut verschlossen	Borsäure- Acetyl- cystein	108,0	Benzalkoniumchlorid
1%	5,5			99,3	Chinolin-8- ol-sulfat
D 2%	5,7			99,1	
4%	5,9	-	-	97,5	
E 1%	3,2	-	in stabili- sierter steri- ler Lösung	104,0	

Tab. 45 Zusammensetzung und Gehalt der untersuchten Adrenalin-Fertigarzneimittel

Rezeptur	pH	Stabilisatoren	Stickstoffbe- gasung	Einkeimungs- verfahren	Aufbewahrung maximal nach Anbruch	Konservierungs- mittel
Neutrale Adrenalin- Augentropfen DAC 1%	7,0	Natriumdisulfit Kaliumhydroxy- chinolinsulfat	ja	Entkeimungs- filtration	6 Monate 8 Tage (Kühlschrank)	Phenyl- quecksilberborat
Ocologuttae Adrenalin neutrales 1% FNA	7,2	Ascorbinsäure	nein	Entkeimungs- filtration	1 Monat 1 Monat (Kühlschrank)	Phenyl- quecksilberborat
Ocologuttae Epinephrini 2% AB-DDR 1%	4,9	Natriumpyro- sulfat	nein	Entkeimungs- filtration	3 Monate 30 Tage (kühl)	Thio- mersal
Ocologuttae Adrenalin 1% Disp. Dan. u3 Add.	3,1	Natriumpyro- sulfat	nein	bei 100°C 20 Minuten in geschlos- senem Be- hältnis	1/2 Jahr	Phenyl- quecksilbernitrat

Tab. 46 Zusammensetzung, Herstellungs- und Lagerungsbedingungen der untersuchten Adrenalin-Rezepturzubereitungen

In Veränderung der eingangs erwähnten Verfahrensweise wurden beim Abtropftest nur 2x täglich 2 Tropfen abgetropft, entsprechend der Dosierungsanleitung der Fertigarzneimittel.

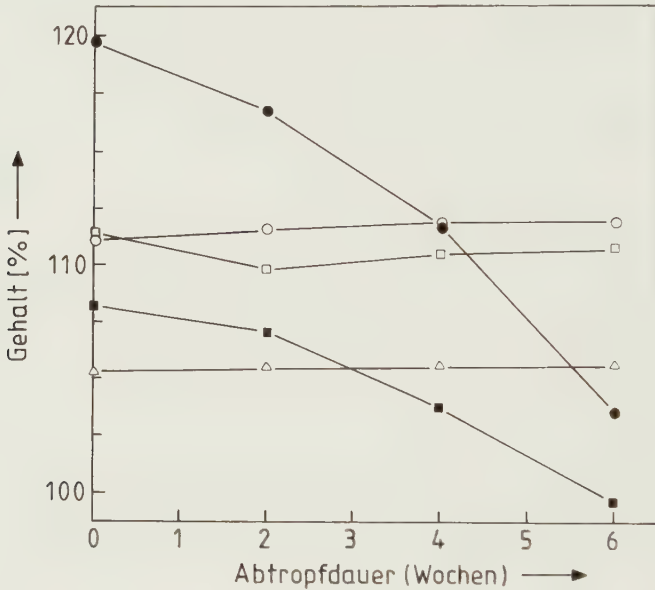


Abb. 37 Veränderungen des Adrenalingehalts von Fertigarzneimitteln während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation

- Präparat A 1%ige Lösung (Pipettenflasche)
- Präparat A 1%ige Lösung (fest verbundener Tropfaufsatz)
- Präparat B 1%ige Lösung
- △- Präparat B 2%ige Lösung
- Präparat C 1%ige Lösung

Wie Abb. 37 zeigt, erleiden bei den Adrenalin-Mono-Präparaten die Pipettenflaschen-Zubereitung von A und das Präparat C deutliche Gehaltsverluste von 16% bzw. 12%. Das gleiche, nunmehr arzneibuchkonforme Präparat A mit fest verbundener Tropfeinrichtung, erwies sich hingegen als stabil. Auffällig ist auch, daß der Hersteller offenbar mit Verwendung des neuen Packmit-

tels zugleich auch eine Reduzierung des Stabilitätszuschlags vorgenommen hat.

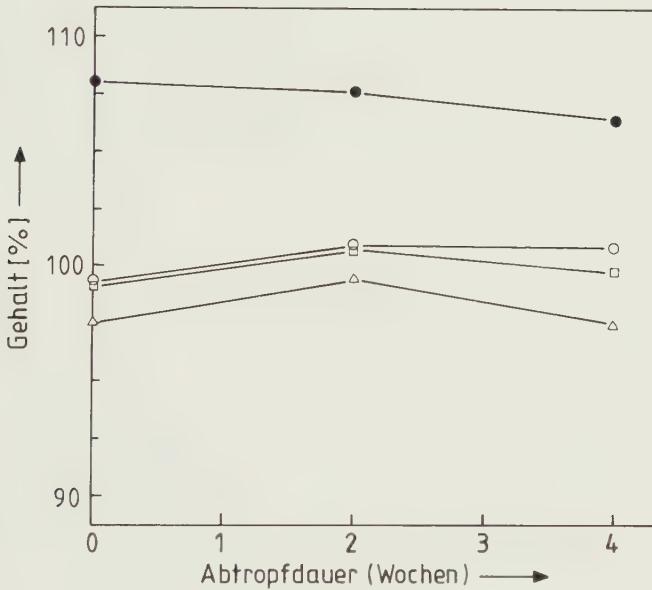


Abb. 38 Veränderung des Adrenalingehalts von Fertigarzneimittel-Kombinationspräparaten während einer 4-wöchigen Anwendungssimulation

- Präparat D 1%ige Lösung
- Präparat D 2%ige Lösung
- △- Präparat D 4%ige Lösung
- Präparat E 1%ige Lösung

Bei den Adrenalin-Kombinations-Präparaten (Abb. 38) war im Untersuchungszeitraum von 4 Wochen unter den gewählten Versuchsbedingungen bei Präparat E ein Gehaltsverlust von 1,6% nachweisbar. Die übrigen Präparate wiesen im Rahmen der Fehlerbreite der Methode praktisch keine Gehaltseinbußen auf.

Präparat D lag in verschiedenen Konzentrationen vor. Diese Konzentrationsunterschiede beziehen sich jedoch auf Pilocarpin,

welches nicht Gegenstand dieser Untersuchung war. Der bei allen 3 Präparaten identische Adrenalingehalt bleibt nahezu gleich.

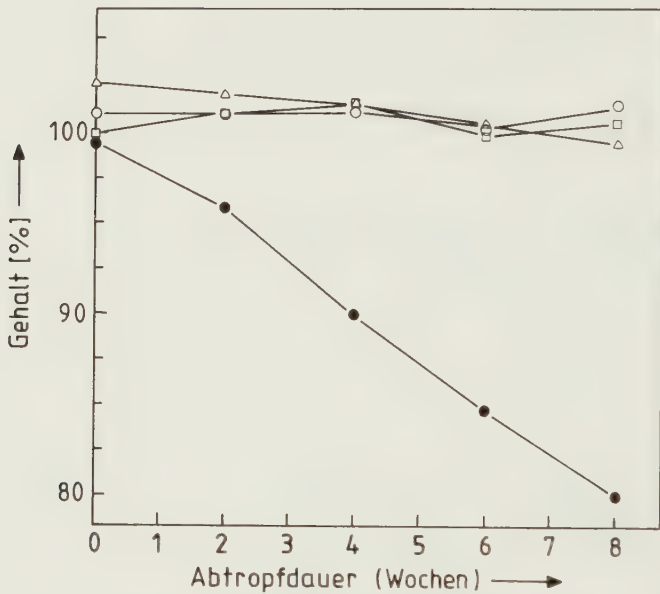


Abb. 39 Gehaltsveränderungen von Adrenalin-Augentropfen-Rezepturen während einer 8-wöchigen Anwendungssimulation

- Ocgtt. Adrenalini Disp. Dan. 63 Add.
- Ocgtt. Epinephrini 2. AB-DDR
- △- Ocgtt. Adrenalini neutrales FNA
- Neutrale Adrenalin-Augentropfen DAC

Bei den untersuchten Adrenalin-Rezepturen trat bei den Neutralen Adrenalin-Augentropfen des DAC eine deutliche Gehaltsabnahme auf. Dabei wurde nach etwa 4-wöchiger Abtropfdauer bereits die 90%-Grenze unterschritten.

Der DAC schreibt allerdings für seine Neutralen Adrenalin Augentropfen (Tab. 46) eine achttägige Aufbrauchfrist nach Anbruch vor.

Auch im Falle der zweiten neutralen Rezepturzubereitung, den Oculoguttae Adrenalini neutrales FNA, fand eine Gehaltsminderung statt. Diese ist jedoch mit einem Betrag von etwa 3,5% geringer als jene der DAC-Formulierung.

Bei den beiden anderen Rezepturen wurde auch nach 8-wöchiger Lagerung praktisch kein Gehaltsverlust ermittelt. Das bessere Stabilitätsverhalten dieser Rezepturen kann auf ihre niedrigen pH-Werte zurückgeführt werden.

2. Stabilität von Konservierungsmitteln während der Anwendung

Während des Aufbewahrungs- und Gebrauchszeitraums von Augentropfen muß nicht nur die Stabilität von Wirkstoffen, sondern auch die von Konservierungsmitteln gewährleistet sein. Aus diesem Grund ist neben dem mikrobiologischen Zustand der Lösungen auch die Möglichkeit eines chemischen Abbaus sowie der physikalischen Bindung an Behältermaterialien zu beachten.

Beim Einsatz von Konservierungsmitteln in Augentropfen muß ein Kompromiß zwischen der zur Wirkung nötigen und einer der Verträglichkeit dienlichen Konzentration gefunden werden. Verringert sich die Konservierungsmittelkonzentration durch Instabilität, so wird bei Unterschreitung der minimalen Hemmkonzentration bald das Stadium der Wirkungslosigkeit eintreten.

2.1 Verluste an Konservierungsmittel bei Anwendung von wirkstofffreien Lösungen

Zur Untersuchung des Verlusts von Konservierungsmitteln während der Anwendung wurden die häufigsten Augentropfen-Konservierungsmittel in üblichen Anwendungskonzentrationen in verschiedene Augentropfenbehältnisse verbracht. Diese Lösungen wurden dann simulierten Gebrauchsbedingungen durch Abtropfen von 3x täglich 2 Tropfen unterworfen.

Als Packmittel dienten Rezeptur-Augentropfenflaschen mit Tropfaufsätzen aus verschiedenen Materialien, sowie ein oder zwei Vollkunststoffbehältnisse.

Der Glasteil der Rezeptur-Augentropfenflaschen bestand durchwegs aus Braunglas der hydrolytischen Klasse I. Bei den Tropfaufsätzen handelte es sich in zwei Fällen um transparenten Silikonkautschuk. In einem Fall besaß dieser Silikonkautschukteil noch eine Kugeltropferkanüle aus Polypropylen. Aus Chlorbutylkautschuk war das Material des dritten Tropfaufsatzes. Die vierte verwendete Glasflasche, die sowohl in der Rezeptur als auch in der Industrie Verwendung findet, war mit einem Tropfer aus Polypropylen versehen.

Die Kunststoffbehältnisse bestanden beide aus weichmacherfreiem Polyethylen niederer Dichte (ND-PE); einem Behältnis war 3% Titandioxid als Weißpigment zugesetzt.

Wie aus Abb. 40-45 ersichtlich ist, treten bei den verschiedenen Konservierungsmitteln im Abtropfversuch Unterschiede des Sorptionsverhaltens auf.

Dabei können 2 Gruppen unterschieden werden:

Die erste Gruppe bilden Benzalkoniumchlorid (Abb. 40) und die Chlorhexidinsalze (Abb. 41 und 42). Abgesehen von einem nur bei Benzalkoniumchlorid eingesetzten Naturgummi-Material für den Tropfer zeigen sich keine signifikanten Gehaltsabnahmen. Die auftretenden Gehaltsschwankungen bewegen sich im Bereich der Fehlergrenze der angewandten Bestimmungsverfahren.

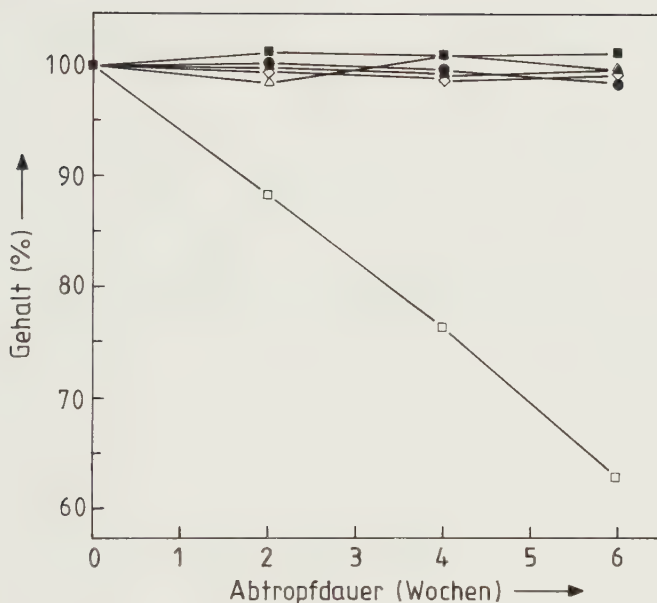


Abb. 40 Gehaltsveränderungen von Benzalkoniumchlorid-lösungen (0,01%) in verschiedenen Augentropfen-behältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4)

- ◇- Braunglas mit Tropfer Silikonkautschuk, transparent (Aponorm®)
- Braunglas mit Tropfer Silikonkautschuk, transparent mit Kugeltropferkanüle PP (Zentrop®)
- △- Braunglas mit Tropfer Chlorbutylkautschuk (Retro® blau)
- ▲- Braunglas mit Tropfer PP (Stella®)
- Vollkunststoffgefäß aus ND-PE + 3% TiO₂, weichmacherfrei
- Vollkunststoffgefäß aus ND-PE, natur, weichmacherfrei
- Braunglas mit Tropfer Naturgummi (Retro® rot)

Bei Anwendung des Naturgummitropfers wurde der Stabilitätsgrenzwert von 90% bereits nach knapp zweiwöchiger Anwendung unterschritten.

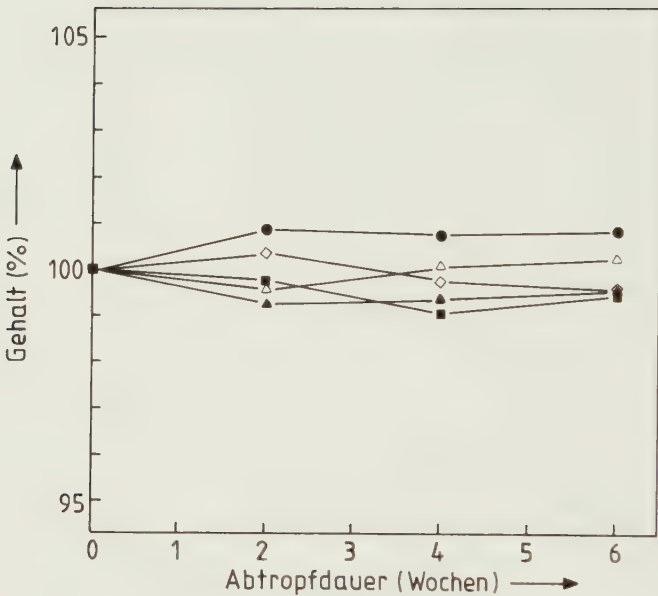


Abb. 41 Gehaltsveränderungen von Chlorhexidindiacetatlösungen (0,01%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation ($n = 4$) (Symbole siehe Abb. 40)

Die zweite Gruppe bilden die alkoholischen Konservierungsmittel Chlorbutanol (Abb. 43) und Phenylethanol (Abb. 44) sowie die Organoquecksilberverbindungen (Abb. 45-48). Innerhalb der Gruppe wird vor allem eine Sorption an Silikonkautschuk beobachtet.

So treten bereits nach zweiwöchiger Lagerung in Augentropfenflaschen mit Silikongummitropfer folgende Konservierungsmittelverluste auf: Chlorbutanol 30,2%, Phenylethanol 1,7%, Phenylquecksilberacetat 26%, Phenylquecksilberborat 27,8%, Phenylquecksilbernitrat 24,4% und Thiomersal 6,4%.

Ist der Silikongummitropfer noch mit einer Kugeltropferkanüle aus Polypropylen versehen, so vermindert sich die zur Verfügung stehende Sorptionsfläche für die Organoquecksilberverbindungen.

Phenylquecksilberacetat verliert nur noch 6,6% vom Ausgangswert, Phenylquecksilberborat 5,1%, Phenylquecksilbernitrat 6,5% und Thiomersal 3,1%.

Die Alkohole zeigen ein anderes Verhalten. Bei ihnen sind die Prozentsätze der Abnahme im Verhältnis mit der Kugeltropferkanüle mit 41,5% für Chlorbutanol und 5,1% für Phenylethanol höher als beim Gefäß ohne diese.

Der Grund hierfür ist eine Permeation. Der Tropfer des einen Packmittels ist durch eine Überwurfkappe aus Polypropylen geschützt, während jener ohne Überwurfkappe eine ungehinderte Permeation erlaubt.

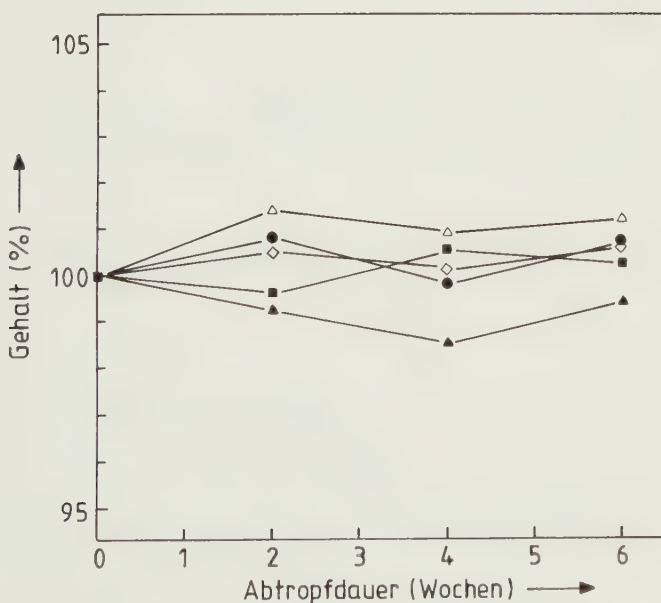


Abb. 42 Gehaltsveränderungen von Chlorhexidindiglukonat-lösungen (0,014%) in verschiedenen Augentropferbehältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

Gleiches Verhalten kann ebenfalls nach 4 Wochen beobachtet werden. Im Gefäß ohne Kugeltropferkanüle wird nunmehr 38,2% Chlorbutanol, 7,8% Phenylethanol, 44,6% Phenylquecksilberacetat, 46,7% Phenylquecksilberborat, 45,1% Phenylquecksilbernitrat und 14% Thiomersal sorbiert; in jenem mit Kugeltropferkanüle 82,1% Chlorbutanol, 8,3% Phenylethanol, 18% Phenylquecksilberacetat, 15,3% Phenylquecksilberborat, 13,8% Phenylquecksilbernitrat sowie 9% Thiomersal.

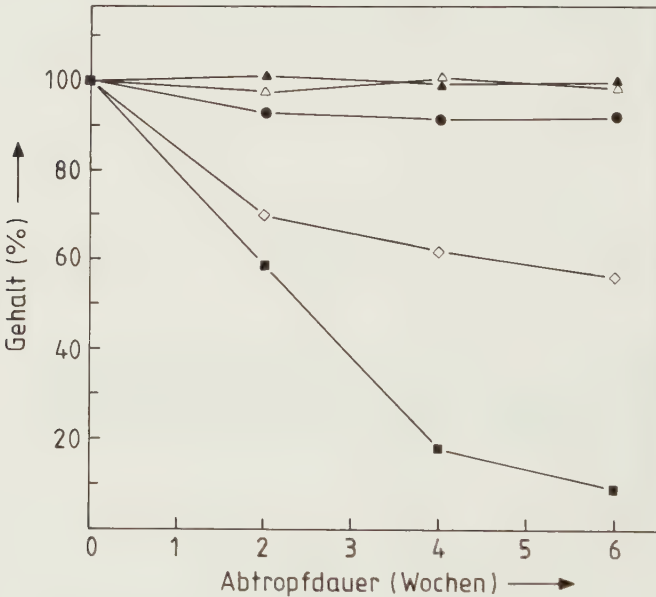


Abb. 43 Gehaltsveränderungen von Chlorbutanolösungen (0,5%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

Die Wiederfindungsraten in Prozent vom Ausgangswert nach 6-wöchigem Abtropfen sind in Tab. 47 zusammengefaßt.

Aus dieser Tabelle kann auch entnommen werden, daß die Verbindungen der zweiten Gruppe ebenfalls mehr oder minder stark an Polyethylen sorbiert werden.

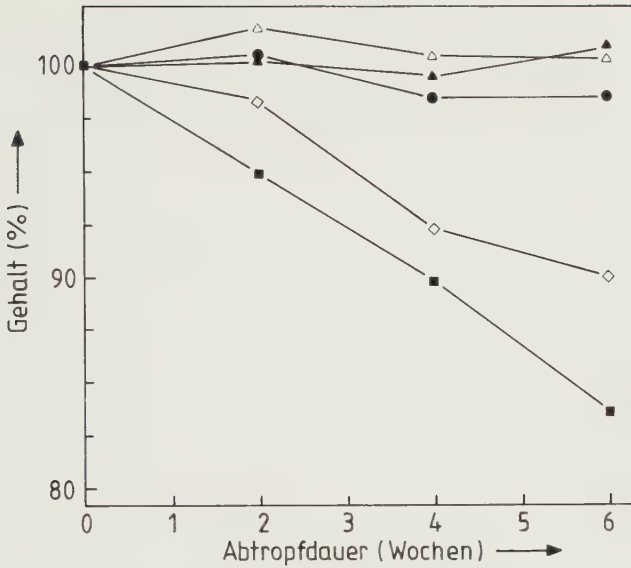


Abb. 44 Gehaltsveränderungen von Phenylethanollösungen (0,5%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

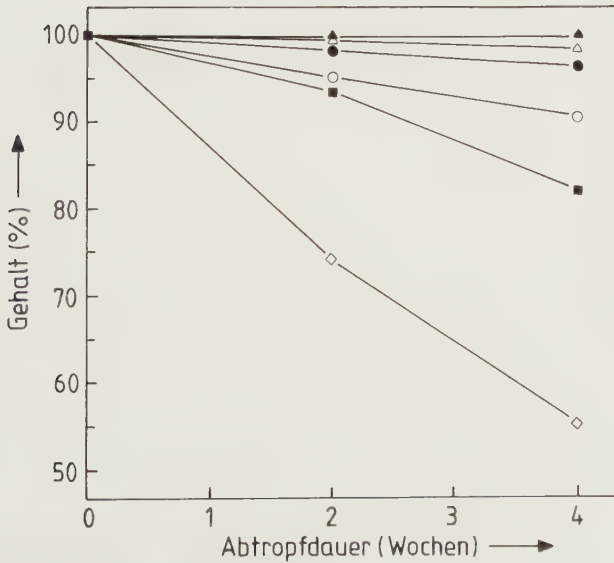


Abb. 45 Gehaltsveränderungen von Phenylquecksilberacetatlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 4-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

Eine Beziehung zwischen eingesetztem Salz sowie Art und Ausmaß der Sorption konnte bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht festgestellt werden.

Packmittel		Konservierungsmittel								Thio- mersal
		Benzal- konium- chlorid	Chlorhexidindi- acetat	glukonat	Chlor- butanol	Phenyl- ethanol	Phenylquecksilber- acetat borat nitrat			
Braunglas mit Tropfer aus	Silikonkautschuk transparent (Aponorm®)	99,3	99,6	100,6	56,0	89,8	55,3 ^x	53,3 ^x	54,9 ^x	78,9
	Silikonkautschuk transparent mit Kugeltropferkanüle PP (Zentrop®)	101,2	99,6	100,2	8,9	83,4	82,0 ^x	84,7 ^x	86,2 ^x	91,0
	Chlorbutylkautschuk (Retro® blau)	99,5	100,3	101,2	98,3	100,2	98,4 ^x	99,0 ^x	98,8 ^x	94,1
	Naturgummi (Retro® rot)	62,8	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	Polypropylen (PP) (Stella®)	99,7	99,6	99,4	99,8	101,6	99,9 ^x	99,2 ^x	101,1 ^x	99,6
Vollkunststoffgefäß aus	ND-PE weichmacherfrei + 3% TiO ₂ Fa. Raku	98,4	100,9	100,7	92,0	98,4	96,4 ^x	97,2 ^x	95,0 ^x	96,4
	ND-PE weichmacherfrei natur Fa. Raku	101,2	∅	∅	∅	∅	90,5 ^x	91,8 ^x	91,0 ^x	∅

Tab. 47 Wiederfindungsrate von Augentropfen-Konservierungsmitteln in verschiedenen Packmaterialien nach einer 6-wöchigen Anwendungssimulation

^xVersuchsdauer nur 4 Wochen

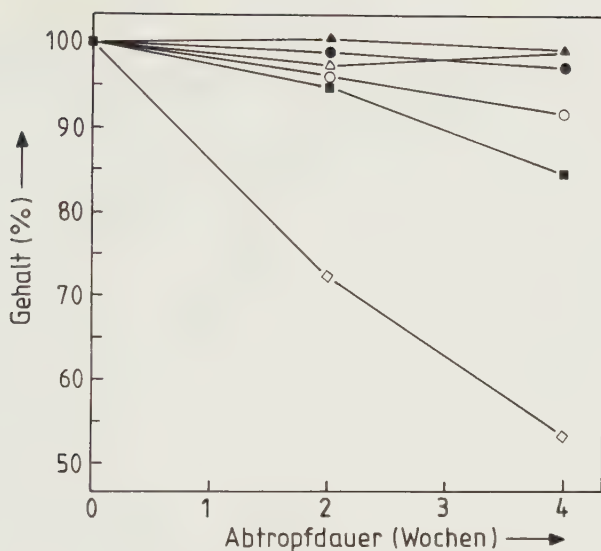


Abb. 46 Gehaltsveränderungen von Phenylquecksilberboratlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 4-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

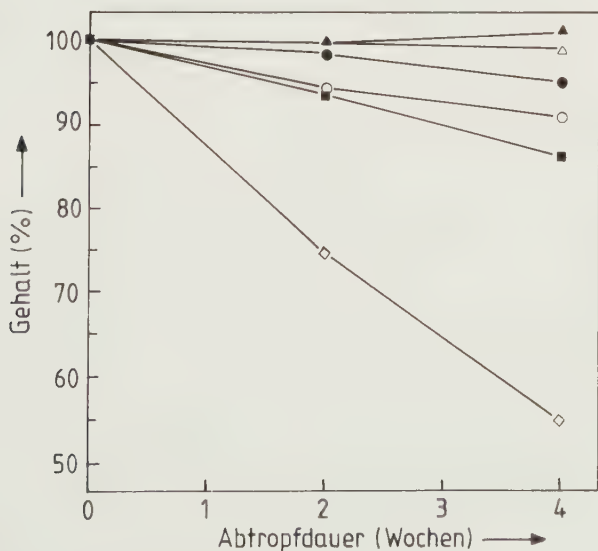


Abb. 47 Gehaltsveränderungen von Phenylquecksilbernitratlösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 4-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

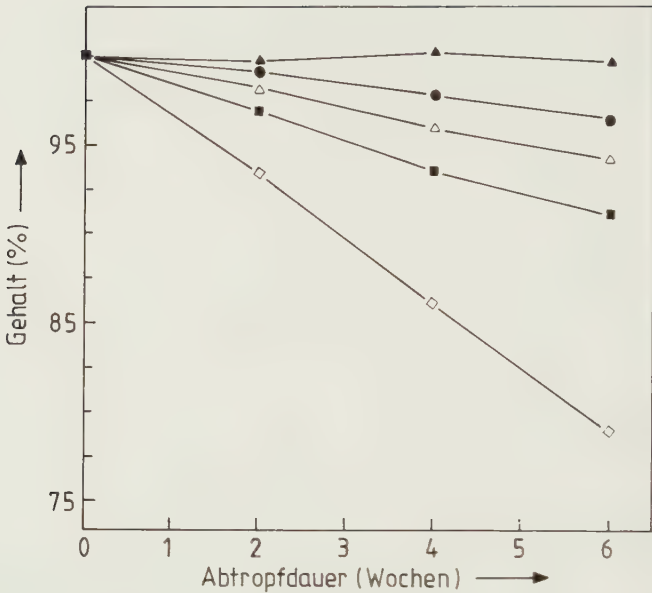


Abb. 48 Gehaltsveränderungen von Thiomerallösungen (0,002%) in verschiedenen Augentropfenbehältnissen während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4) (Symbole siehe Abb. 40)

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Unter den gewählten Bedingungen erleidet Thiomersal Verluste bei den meisten der eingesetzten Augentropfenbehältnisse. Ebenfalls häufige Wechselwirkungen mit den Tropftüllen der Augentropfenflaschen sind bei den Phenylquecksilbersalzen und den alkoholischen Konservierungsmitteln Chlorbutanol und Phenylethanol zu beobachten. Bei Benzalkoniumchlorid ist eine erhebliche Sorption an einen Naturgummitropfer festzustellen. In allen anderen Fällen tritt bei Benzalkoniumchlorid und den Chlorhexidinsalzen mit den angegebenen Augentropfenbehältnissen unter den gewählten Versuchsbedingungen praktisch keine Gehaltsminderung auf.

2.2 Verluste an Konservierungsmittel bei Anwendung von Fertigarzneimitteln

Um auch Aussagen über Konservierungsmittelverluste bei Anwendung von Fertigarzneimitteln treffen zu können, wurden solche ebenfalls in die Untersuchung einbezogen.

Da die enthaltenen Wirkstoffe die hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung der Konservierungsmittel erheblich erschweren können, wurden nur Zubereitungen ohne organische Wirkstoffe berücksichtigt. Als solche boten sich die künstlichen Tränenflüssigkeiten sowie Präparate mit anorganischen Wirkstoffen an.

Die Tab. 48 zeigt das Ergebnis der Untersuchung handelsüblicher Augentropfenlösungen.

Für die Präparate B 1 und B 5 war kein Konservierungsmittelgehalt deklariert. Mikrobiologisch konnte jedoch ein Gehalt von 0,052 mg/ml Benzalkoniumchlorid für B 1 und 0,112 mg/ml für B 5 ermittelt werden. Legt man dies zugrunde, so ist für benzalkoniumchloridhaltige Präparate ein der Deklaration entsprechendes Untersuchungsergebnis festzustellen. Lediglich B 5 zeigt eine Überdosierung um etwa 10%.

Ein anderes Bild zeigen hingegen die untersuchten chlorhexidindiglukonat-, chlorbutanol- sowie thiomersalhaltigen Fertigarzneimittel. Unter den gewählten Bedingungen weisen sie alle einen Mindergehalt im Vergleich zur deklarierten Konservierungsmittelmenge auf. Im Falle der Präparate CG 2 und CG 3 liegen die ermittelten Werte so niedrig, daß sich hochdruckflüssigkeitschromatographisch kaum noch intakte Substanz nachweisen läßt. Bestätigt wurden die Ergebnisse bei CG 1, CG 2 und CG 3 durch die mikrobiologischen Befunde.

Anders verhielt es sich bei den thiomersalhaltigen Zubereitungen T 1 und T 2. Hier wurden zwar hochdruckflüssigkeitschromatographisch nur 78% und 72% der deklarierten Menge gefunden, mikrobiologisch wurde jedoch eine fast 100%ige Wiederfindungsrate ermittelt.

Präparat	Tonizität mOsmol	Viskosität cSt	Indikation	Inhaltsstoffe	Konservierungsmittel dekl. Gehalt	gefundener Gehalt % des deklarierten
B 1	7,4 280	1,44	künstliche Tränen	PVP 0,2 g/ml in isotonischer Lösung	Benzalkonium- chlorid (Gehalt nicht dekla- riert)	gefunden 0,0052%
B 2	7,4 254		künstliche Tränen	HPMC 5 mg/ml in tränenisohydri- scher und -iso- tonischer Lösung	Benzalkonium- chlorid 0,1 mg/ml	102,4
B 3	6,6 295	128	Reinigungs- u. Benetzungslö- sung f. Pro- thesenträger	Octylphenoldeka- ethylenglykol- ether 2,5 mg/ml	Benzalkonium- chlorid 0,2 mg/ml	101,2
B 4	7,4 285		künstliche Tränen	Dextran 1 mg/ml HPMC 3 mg/ml Dinatriumedetat 0,5 mg/ml	Benzalkonium- chlorid 0,1 mg/ml	105,1
B 5	7,4 290		künstliche Tränen	PVP 50 mg/ml	Benzalkonium- chlorid (Gehalt nicht dekla- riert)	gefunden 0,0112%
CG 1	7,2 285	4,6	Behandlung umweltbeding- ter Reizer- scheinungen	Salicylsäure 0,01 g/10 ml Rosenwasser 1 g/10 ml	Chlorhexidin- diglukonat 0,5 mg/10 ml	77,7* 61,3**
CG 2	6,0 290	1,0	zur Glaskör- peraufhellung gegen Linsen- trübung	KJ 0,5 g/10 ml CaCl ₂ 0,05 g/10ml Na ₂ S ₂ O ₃ 0,5mg/ml	Chlorhexidin- diglukonat 0,5 mg/10 ml	3,1* 2,6**
CG 3	6,5 275	1,1	gegen Linsen- trübung, Glas- körpertrübung	KJ 10 mg/ml Na ₂ S ₂ O ₃ 0,5mg/ml	Chlorhexidin- diglukonat 0,05mg/10ml	4,1
C 1	4,6 285 2,7 290 4,0 295	4,3	künstliche Tränen	PVP 14 mg/ml	Chlorbutanol 5 mg/ml	72,4* 20,2** 42,8***
T 1	7,2 1570		zur Behand- lung v. Horn- hautödemen	NaCl 50 mg/ml Dinatriumedetat 1 mg/ml	Thiomersal 0,4 mg/ml	78,0
T 2	1,3 1180	1,3	gegen Pilz- u. bakterielle Infektionen	Natriumpropionat 0,5g/10ml in ge- puffelter Lösung	Thiomersal (Ge- halt nicht de- klariert)	gefunden 0,00144%

Tab. 48 Übersicht über die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Konservierungsmitteln mittels HPLC in Augentropfen-Fertigarzneimitteln

* Verfalldatum zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht überschritten

** Verfalldatum zum Zeitpunkt der Untersuchung überschritten

*** Kleinpackung mit 2,5 ml

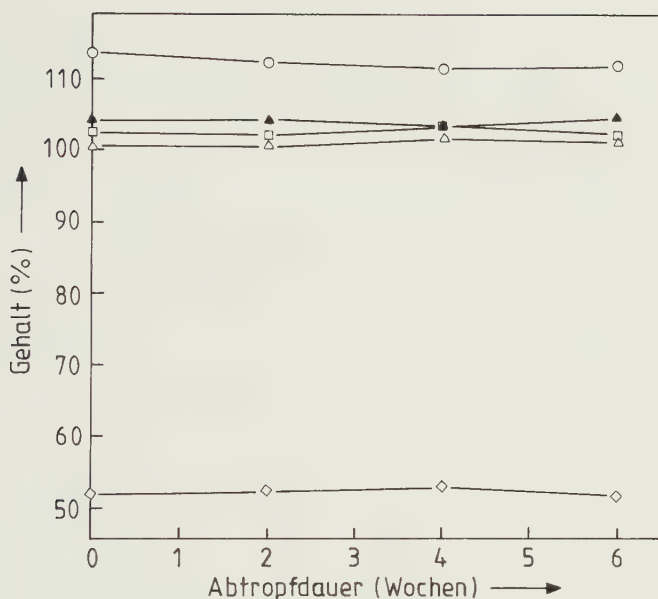


Abb. 49 Gehaltsveränderungen von Benzalkoniumchlorid in
Fertigarzneimitteln während einer 6-wöchigen
Anwendungssimulation (n = 4)

- ◇- Präparat B 1
- Präparat B 2
- △- Präparat B 3
- ▲- Präparat B 4
- Präparat B 5

Bei den chlorbutanolhaltigen Zubereitungen, bei welchen eine mikrobiologische Gehaltsbestimmung nicht möglich ist, enthält das Präparat C 1 mit überschrittenem Verfalldatum mit 20,2% deutlich weniger Konservierungsmittel als das noch nicht verfallene mit 72,4%. Alle drei Präparate mit der Bezeichnung C 1 besitzen jedoch weniger Konservierungsmittel als deklariert.

Sämtliche aufgeführten Fertigarzneimittel wurden dann dem 6-wöchigen Abtropftest unterzogen.

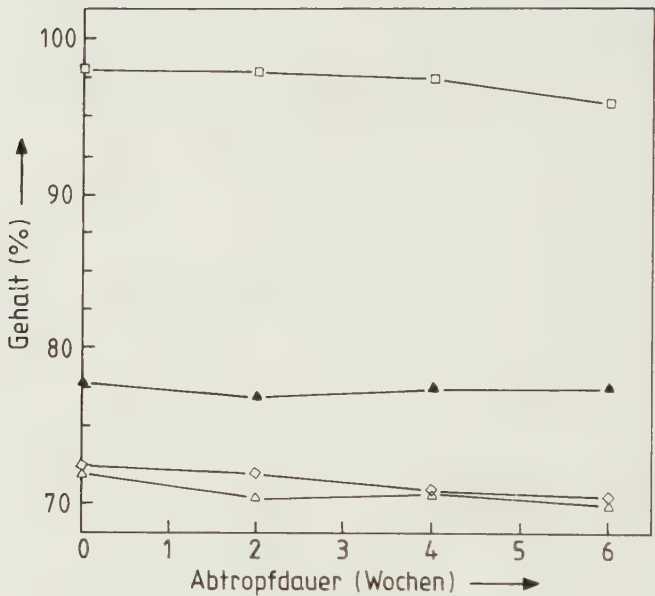


Abb. 50 Gehaltsveränderungen von Chlorbutanol, Thiomersal und Chlorhexidindigluconat in Fertigarzneimitteln während einer 6-wöchigen Anwendungssimulation (n = 4)

- ◇- Präparat C 1
- Präparat T 1
- △- Präparat T 2
- ▲- Präparat CG 1

Wie aus Abb. 49 ersichtlich ist, tritt bei den benzalkonium-chloridhaltigen Zubereitungen im Untersuchungszeitraum keine signifikante Gehaltsabnahme auf.

Bei den in Abb. 50 dargestellten Konservierungsmitteln kann man erkennen, daß die thiomersal- und chlorbutanolhaltigen Präparate Verluste in der Größenordnung von 1,5 - 2,5% erleiden, während das chlorhexidinhaltige nahezu konstant bleibt.

Nicht aufgezeichnet sind die Ergebnisse der Präparate CG 2 und CG 3, da bei ihnen, bedingt durch ihren niedrigen Ausgangsgehalt, zu stark schwankende Ergebnisse erhalten wurden.

Alle Fertigarzneimittel aus Abb. 49 und Abb. 50 waren in Niederdruck-Polyethylen-Behältnisse verpackt. Bezieht man die Ergebnisse der Untersuchung der reinen Konservierungsmittellösungen in diesen Packmitteln vergleichsweise ein, zeigt sich gute Übereinstimmung. Bei Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidindiglukonat konnten hier wie dort unter den gegebenen Bedingungen keine Gehaltsabnahmen festgestellt werden.

Thiomersal und Chlorbutanol hingegen weisen geringe Verluste im 6-wöchigen Versuchszeitraum in einer Größenordnung von 2,2% bzw. 2% auf.

3. Diskussion

Daß die Verpackung eine sehr wichtige Funktion zur Stabilisierung von Adrenalin ausüben kann, läßt sich am Beispiel des Präparats A zeigen. Das Adrenalin liegt hier in Form eines Borsäurekomplexes vor. Aufgrund der guten Gehaltskonstanz in der neuen Verpackung ist anzunehmen, daß noch ein weiterer Stabilisator eingesetzt sein kann. Nach der Literatur sind relativ stabile Adrenalinzubereitungen bei Kombination mit Borsäure und Bisulfit zu erwarten (110,111).

Präparat C wurde durch Borsäure und Acetylcystein stabilisiert. Der Gehaltsverlust von etwa 9% in 6 Wochen läßt die Notwendigkeit einer Schutzfrist sehr deutlich erkennen. Nach RAETHER (112) erreicht man durch gemeinsame Anwendung von Bisulfit und Acetylcystein eine dreimal bessere Stabilisierung als mit den Einzelkomponenten.

Bei den Präparaten B und E ist die hohe Gehaltskonstanz insbesondere auf die niedrigen pH-Werte zurückzuführen, wobei eine schlechtere Verträglichkeit für den Patienten in Kauf zu nehmen ist.

Das Präparat D enthält 8-Hydroxychinolinsulfat als Konservierungsmittel, welches gleichzeitig stabilisierend auf Adrenalin wirkt. Die Zusammensetzung Adrenalin, Borsäure, Bisulfit sowie Oxychinolinsulfat ist in einigen Ländern patentrechtlich geschützt (113).

Bei den Rezepturzubereitungen wird diese Kombination vom DAC 79 bei seinen "Neutralen Adrenalin-Augentropfen" eingesetzt. Sie besitzt jedoch in Gegenwart von Sauerstoff einen eingeschränkten Stabilisierungseffekt.

Die bessere Stabilität des Präparats G gegenüber der DAC-Zubereitung findet mit dem tieferen pH-Wert von etwa 5,5 eine Erklärung.

Die andere neutrale Adrenalin-Rezeptur enthält Ascorbinsäure als Redoxstabilisator. Ihre Wirksamkeit scheint dem beschriebenen Stabilisatorkomplex aus dem DAC überlegen. Eine Gehaltsabnahme konnte in 6 Wochen nur im Bereich von 3,5% festgestellt werden.

Die Adrenalinzubereitungen des 2. AB-DDR und der Pharm. Dan. Add. 1963 besitzen einen sauren pH-Wert von pH 4,9 bzw. pH 3,1. Dieser und der Zusatz von Bisulfit üben einen stabilisierenden Effekt auf die Zubereitungen aus. Die in den Rezepturen ebenfalls enthaltene Borsäure bildet mit dem Adrenalin einen Komplex und schützt es so vor einer Reaktion mit Bisulfit.

Bisulfit allein würde eine Reaktion mit Adrenalin zu einem Sulfonsäurederivat eingehen (114,115). Eine Stickstoffbegasung wird bei der Rezepturbereitung nicht vorgenommen. Diese würde sich auch nachteilig auswirken, da Zersetzungen unter Sauerstoffausschluß in Lösungen mit Sulfit schneller ablaufen sollen, als in Lösungen ohne Sulfit (36).

Wie aus unseren Untersuchungsergebnissen hervorgeht, ist die präventive Festlegung einer Aufbrauchfrist auch wegen möglicher chemischer Instabilität von Augenarzneimitteln im Prinzip gerechtfertigt.

Dies gilt umso mehr, als beim Verbraucher deutlich ungünstigere Lagerbedingungen, insbesondere zeitweilig höhere Temperaturen von 25°C und darüber, vorausgesetzt werden müssen.

Die unterschiedlichen Veränderungen des Adrenalingehalts während der Aufbrauchfrist machen zweifelsfrei deutlich, welche Bedeutung die Qualität der Arzneimittelentwicklung einschließlich eines geeigneten Packmittels besitzt.

Konzentrationsveränderungen von Konservierungsmitteln treten bei geeigneter Verpackung während des sechswöchigen Gebrauchs nur in geringem Umfang aus. Festgestellte Mindergehalte bei Fertigarzneimitteln hatten andere Ursachen und bestanden bereits vor Beginn des Aufbrauchszeitraums.

Ungeeignete Packmittel hingegen führen während des Abtropfens zu signifikanten Abnahmen an Konservierungsmittel, die den Grenzwert von 90% deutlich unterschreiten können.

Die Auswahl des Packmittels hat deshalb gerade für die Anwendung eines Präparats besondere Bedeutung.

Unter diesem Aspekt erscheint der Einsatz von Augentropfenflaschen mit Silikonkautschuktropfer für Thiomersal, das in der Anlage A des DAC 79 am häufigsten eingesetzte Konservierungsmittel, wenig geeignet.

Gleiches gilt für Phenylquecksilbersalze und alkoholische Konservierungsmittel bei Verwendung von Silikonkautschuktropfern, sowie für Benzalkoniumchlorid im Zusammenhang mit Naturgummi.

Rezepturvorschriften und Anwendungstabellen für geeignete Konservierungsmittel sollten deshalb auch auf den jeweils einzusetzenden Behältnis- und Tropfertyp eingehen.

Zur Absicherung der Stabilität von Augentropfen während des Gebrauchs sollten für die Zulassung von wäßrigen Augenarzneimitteln die Ergebnisse eines 6-wöchigen Abtropfversuchs nachgewiesen werden. Dabei sollten zusätzlich normierte Bedingungen, wie konstante Lagertemperatur, Vermeidung von Lichtzutritt sowie dichter Verschluß der Behältnisse eingehalten werden.

Weiter sollten aber auch Versuche unternommen werden, welche bei einer praktischen Anwendung durch den Patienten auftretende Bedingungen Einfluß auf in Gebrauch befindliche Augentropfen haben.

Über die näheren Bedingungen einer Aufbrauchsfrist in einer künftigen Ausgabe des Deutschen Arzneibuchs können anhand der wenigen, nunmehr verfügbaren Daten keine konkreten Angaben gemacht werden. Sie erscheint sowohl für Fertigarzneimittel als auch für Rezepturen im Interesse der Arzneimittelsicherheit notwendig.

Aufbrauchfristen können auch dazu beitragen, sonst notwendige unphysiologische pH-Werte oder zusätzliche Anwendung von Stabilisatoren insbesondere in Rezepturarzneimitteln zu vermeiden.

VI. Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität von flüssigen Ophthalmika-Fertigarzneimitteln

Seit der Einführung des DAB 8 im Jahre 1978 werden in der Bundesrepublik Deutschland Qualitätsnormen für Augentropfen-Präparate gefordert, welche bis dahin nicht gesetzlich festgelegt waren.

Die vorliegende Untersuchung von Augentropfen-Präparaten, die in der Bundesrepublik arzneiliche Verwendung finden, hat deshalb das Ziel, den gegenwärtigen Stand der Arzneimittelsicherheit in diesem Bereich zu überprüfen und gegebenenfalls daraus Folgerungen für künftige Ergänzungen oder Veränderungen der Monographie "Augenarzneimittel" zu ziehen.

Zur praktischen Durchführung wurden wäßrige Augentropfen-Fertigarzneimittel der Roten Liste ausgewählt und direkt vom Hersteller bezogen. Die gelieferten Präparate wurden bei 20°C im Klimaraum eingelagert und den entsprechenden Untersuchungen unterworfen⁺⁾ .

Die durchgeführten Qualitätsprüfungen erstreckten sich auf Forderungen der Monographie "Augenarzneimittel" des DAB 8, von welchen insbesondere die Sterilität, die verwendeten Konservierungsmittel, die pH-Werte, die Tonizität und die Viskosität der Zubereitungen überprüft wurden.

1. Arzneiformen und Wirkstoffe bei Ophthalmika-Fertigarzneimitteln

Die in der Roten Liste 1985 genannte Zahl von 346 Präparaten enthält 36 Warenzeichen, die in verschiedenen Darreichungsformen vorliegen. Insgesamt überwiegen Augentropfen mit 62% aller Zubereitungen vor Augensalben mit 26%, Komprimaten mit 7%, sowie Augenwässer mit lediglich 1,5%.

Unter "Sonstige" sind in Abb. 51 6 Injektionslösungen zur Anwendung am Auge, 4 Augengele, ein therapeutisches System, eine

⁺⁾ Wir danken allen Herstellern für die freundliche Überlassung der Präparate.

orale Lösung sowie ein Spray für chronische Bindehautentzündung zusammengefaßt.

Unter den aufgeführten Augentropfen überwiegen mit 94,4% wäßrige Zubereitungen gegenüber 5,6% öligen Augentropfen-Präparaten.

Die Zahl der Suspensionen läßt sich nicht sicher erfassen, da nur 2 suspensoide wäßrige Augentropfen-Präparate als solche deklariert werden. In Anbetracht der Lösungseigenschaften der eingesetzten Substanzen muß mit einer deutlich höheren Zahl von Suspensionszubereitungen gerechnet werden, die nicht als solche benannt sind.

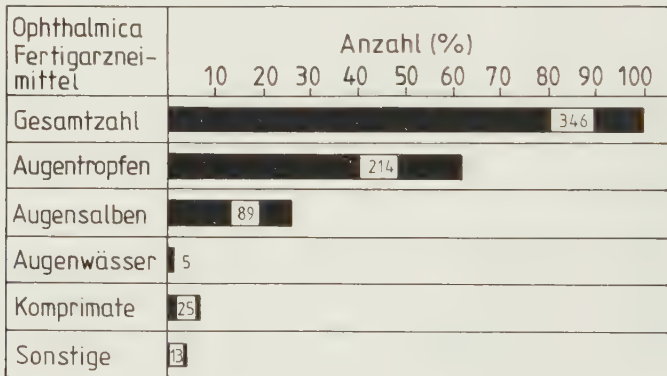


Abb. 51 Häufigkeit verschiedener Darreichungsformen für Augenarzneimittel bei 346 Fertigarzneimitteln der Roten Liste 1985

Bei 6 Präparaten liegen Trockenzubereitungen mit Lösungsmittelampullen vor. In zwei Fällen handelt es sich dabei um das Parasympathomimetikum Aceclidin. Weitere Arzneimittel, die in Form ihrer Trockensubstanz vorliegen, enthalten das Ecothiopatioidid, das Pilocarpin-HCl, Acetylcholin und Catalin-Na.

Einzeldosen-Behältnisse waren in der Roten Liste 1985 insgesamt 8 mal anzutreffen.

Die Häufigkeit verschiedener Indikationsgebiete unter den Augentropfen-Fertigpräparaten geht aus Tab. 49 hervor.

Wirkstoffgruppe	Anzahl	Wirkstoffgruppe	Anzahl
Antibiotika	43	β-Sympatholytika	8
Glukocorticoide	34	Sympathomimetika	72
Lokalanästhetika	11	Virustatika	5
Nucleotide	10	Vitamine	25
Parasympatholytika	15	Sonstige (chem.def.)	57
Parasympathomimetika	32	Sonstige (pflanzl.def.)	38
Sulfonamide	8		

Tab. 49 Häufigkeit verschiedener Wirkstoffgruppen in Augentropfen-Fertigpräparaten der Roten Liste 1985

Am stärksten sind dabei die Sympathomimetika (72), gefolgt von Antibiotika (43) sowie Corticoide (34), Parasympathomimetika (32) und Vitamine (25) vertreten.

Die Gruppe "Sonstige" enthält chemisch definierte, sehr unterschiedliche Substanzen, wie beispielsweise Jodide, Chromoglycinsäure und Clonidin sowie rein pflanzliche Stoffe, wie Aeskulin, aromatische Wässer und andere Pflanzenauszüge.

2. Untersuchung wäßriger Augentropfen-Fertigarzneimittel

Von diesen Arzneimitteln konnten 196 in die folgenden Untersuchungen einbezogen werden:

2.1 Sterilität

Eine wesentliche Anforderung aller Arzneibücher an die Arzneimittelsicherheit von Ophthalmika betrifft deren Keimfreiheit. Zur stichprobenweisen Kontrolle wurde deshalb an 56 willkürlich ausgewählten Fertigarzneimitteln die Prüfung auf Sterilität durchgeführt. Dabei wurden Antibiotika, Chemotherapeutika, Nucleotide und Virustatika ausgeschlossen.

Zur Untersuchung gelangte jeweils der gesamte Inhalt eines 10 ml-Behältnisses des betreffenden Fertigarzneimittels. Bei notwendigen Wiederholungsprüfungen wurde in gleicher Weise verfahren. Alle 56 untersuchten Fertigarzneimittel erwiesen sich unter den Bedingungen des angegebenen Verfahrens als steril.

Das jeweils enthaltene Konservierungsmittel mußte nach der Membranfiltrationsmethode mit Cellulosenitratfiltern abgetrennt werden, wobei gleichzeitig Inaktivatorzusatz zur Spülflüssigkeit erfolgte. Als Nährmedium dienten flüssiges Thioglykolat-Medium, Sojapepton-Casein-Pepton-Medium und Sabouraud-Medium. Die Bebrütung erfolgte jeweils 7 Tage bei 20 bis 25°C und bei 30 bis 35°C.

Der Erfolg der Inaktivierung wurde durch Beimpfen von Lösungen der verschiedenen Konservierungsmittel mit 10^2 bis 10^3 KBE von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 überprüft. Auf diese Weise kontaminierte Konservierungsmittellösungen wurden unverzüglich dem Sterilitätstest unterzogen. Alle zeigten nach dem Bebrütungszeitraum starkes Wachstum.

2.2 Konservierungsmittel

Das DAB 8/DAB 9 fordert in seiner Augentropfen-Monographie: "Wäßrige Augentropfen in Mehrdosen-Behältnissen müssen mit geeigneten Konservierungsmitteln versetzt sein." Und "Auf den Behältnissen müssen zugesetzte Konservierungsmittel angegeben werden."

Beide Forderungen des Arzneibuchs wurden bis auf wenige Ausnahmen von den überprüften Präparaten erfüllt.

Wie aus Tab. 50 hervorgeht, lagen quartäre Ammoniumverbindungen in Form von Benzalkoniumchlorid als am häufigsten in deutschen Augentropfen-Fertigarzneimitteln verwendete Konservierungsmittel vor. An zweiter Stelle folgte die Organoquecksilber-Verbindung Thiomersal, an dritter Stelle Chlorbutanol.

Der β -Phenylethylalkohol war dreimal als synergistischer Zusatz zu Thiomersal zu finden. Als weiterer synergistischer Zusatz wurde Natrium-EDTA achtmal zusammen mit Benzalkoniumchlorid

Konservierungsmittel	Anzahl der Präparate	% von 196
Benzalkoniumchlorid	74	37,75
Thiomersal	36	18,37
Chlorbutanol	28	14,28
Chlorhexidinsalze	12	6,12
Phenylquecksilbersalze	11	5,61
Cetrimoniumchlorid	6	3,06
Benzododeciniumchlorid	4	2,04
Benzethoniumchlorid	2	1,02
Dofamiumchlorid	2	1,02
PHB-Ester	2	1,02
Chinolin-8-ol-sulfat	2	0,51
Cialit	1	0,51
Lauryldimethylbenzyl- ammoniumchlorid	1	0,51
keine Angabe	11	5,61
kein Konservierungsmittel (Eindosenbehältnisse)	5	2,55

Tab. 50 Konservierungsmittel von 196 untersuchten Augentropfen-Fertigarzneimitteln

verwendet. Bei den Chlorhexidin-Salzen wurde mit 78% das Diglukonat und mit 22% das Diacetat eingesetzt. Bei den Phenylquecksilber-Salzen sind Borat und Nitrat jeweils mit 36%, Acetat mit 28% vertreten.

Bemerkenswert erscheint, daß die seit geraumer Zeit wegen ihrer Reizwirkungen am Auge verpönten PHB-Ester in zwei Fällen noch vertreten sind.

2.3 Tonizität

Bei der Angleichung wäßriger Augentropfen an physiologische Bedingungen muß die Tonizität der Lösungen berücksichtigt werden. Das Deutsche Arzneibuch fordert deshalb:

"Augentropfen sollen nach Möglichkeit mit der Tränenflüssigkeit annähernd isotonisch sein", wobei auf strenge Beachtung sowohl aus physiologischen Gründen als auch wegen der bestehenden thera-

peutischen Notwendigkeiten für hypertonische Lösungen verzichtet werden kann.

Dies ist möglich, da das Auge eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber Abweichungen von der Isotonie besitzt. Der schmerzfreie Bereich reicht dabei von Lösungen mit Tonizitätswerten von 225 bis 430 Milliosmol (116). Von den untersuchten Fertigarzneimitteln lagen 146 bzw. 74,5% innerhalb dieses Bereichs.

Abb. 52 zeigt das Ergebnis der Tonizitätsuntersuchung von 196 Augentropfen-Fertigarzneimitteln.

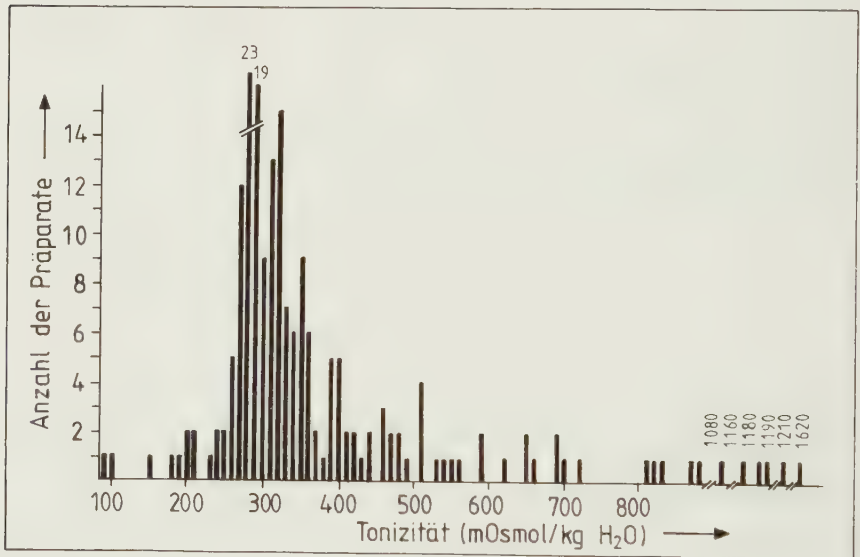


Abb. 52 Tonizitätswerte von 196 wäßrigen Augentropfen-Fertigarzneimitteln

Auch bei Bezugnahme auf wichtige Indikationsgebiete liegt der überwiegende Teil der Werte im tolerierten Bereich, wobei einzelne Zubereitungen erheblich davon abweichen. Bei Chemotherapeutika wird der Toleranzbereich insbesondere wegen der hochdosierten Sulfonamide überschritten. Ebenso wird er für Corticosteroide, die häufig auch hochdosiert angewandt werden, bei verschiedenen Präparaten überschritten. 40 Präparate, entsprechend

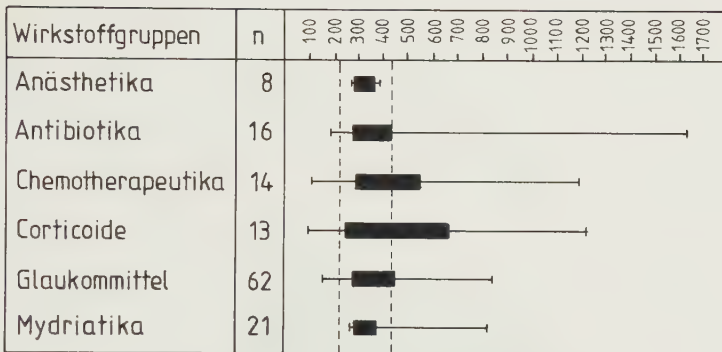


Abb. 53 Tonizitätswerte wichtiger Wirkstoffgruppen mit Toleranzgrenze

----- Toleranzgrenze
 ————— Spannweite mit Maximal- und Minimalwert
 ■■■■■ Bereich mit 2/3 der untersuchten Präparate

20,4%, waren als hypertonisch zu bezeichnen. 10 Fertigarz-
 neimittel, entsprechend 5,1% der untersuchten Präparate, waren
 ausgesprochen hypotonisch und wahrscheinlich nicht isotoni-
 siert.

2.4 pH-Wert

Der pH-Wert ist eines der wichtigsten Verträglichkeitskriterien,
 da zahlreiche Patientenreklamationen wie "Brennen" der Augen-
 tropfen, auf unphysiologische pH-Werte zurückgehen. Nach Unter-
 suchungen von TROLLE-LASSEN (116) liegt der schmerzfreie Tole-
 ranzbereich bei pH 7,3 bis 9,7. Darunter und darüber nimmt die
 Schmerzempfindlichkeit rasch zu.

Wie die Untersuchung von 196 wäßrigen Augentropfen-Fertigarz-
 neimitteln in Abb. 54 zeigt, liegt die Mehrzahl der Präparate
 mit 165, entsprechend 84,2%, leider außerhalb dieses Toleranz-
 bereichs.

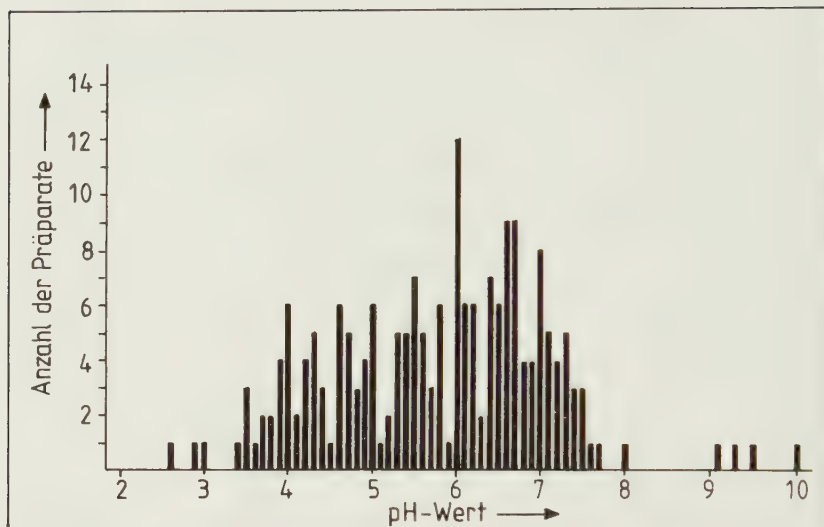


Abb. 54 pH-Werte von 196 Augentropfen-Fertigarzneimitteln

Wertet man die pH-Werte bestimmter Wirkstoffgruppen aus, so werden in Abhängigkeit vom Indikationsgebiet die Unterschiede erkennbar.

Während Antibiotika und Chemotherapeutika sowie Corticosteroide überwiegend im pH-Bereich von 6 bis 7 liegen, müssen bei Lokalanästhetika wegen ihrer Esterstruktur, ferner bei den Glaukommitteln, insbesondere bei Pilocarpin-Zubereitungen wegen der Laktonstruktur sowie, bedingt durch das oxidationsgefährdete Adrenalin bei den Mydriatika, aus Stabilitätsgründen wesentlich tiefere, unphysiologische pH-Werte herangezogen werden. Diese Stabilitätsverbesserung durch tiefe pH-Werte muß vom Patienten in der Regel mit Schmerzempfindung, Auswaschen des Arzneimittels im Tränenstrom, sowie vorübergehend ungünstigen pH-Werten für die Wirkstoffresorption von Basen hingenommen werden. Bedauerlicherweise liegt nur eine sehr kleine Zahl von Trockenpräparaten vor, mit denen extreme pH-Werte vermieden werden könnten.

2.5 Viskosität

Die Wirkungsverlängerung und Verträglichkeitsverbesserung wäßriger Augentropfen-Fertigarzneimittel durch Viskositätserhöhung gewinnt immer noch an Bedeutung. Als viskositätserhöhende Hilfsstoffe werden dabei vorwiegend synthetische oder halbsynthetische makromolekulare Substanzen wegen ihrer gleichbleibenden physikalisch-chemischen Eigenschaften eingesetzt.

Durch Bestimmung der kinematischen Viskosität wurde deshalb untersucht, inwieweit Viskositätserhöhungen bei Fertigarzneimitteln durchgeführt werden. Die kinematische Viskosität wurde gewählt, um die verfügbare Menge an Augenarzneimittellösung nicht durch Dichtebestimmungen zu verbrauchen.

Von 196 Präparaten trugen 80, entsprechend 40,8%, den Vermerk "viskositätserhöht". Bei allen diesen Präparaten war der viskositätserhöhende Zusatz deklariert (Tab. 51).

viskositätserhöhender Zusatz	Anzahl der Präparate	% von 80
Hydroxypropylmethylcellulose	36	45,0
Polyvinylalkohol	12	15,0
Polyvinylpyrrolidon	8	10,0
Methylcellulose	2	2,5
Oculo-Hydrosol	19	23,75
Lacribase	3	3,75

Tab. 51 Anteil der viskositätserhöhenden Hilfsstoffe in wäßrigen Augentropfenpräparaten

Bei Oculo-Hydrosol und Lacribase handelt es sich um Deklarationen bestimmter Hersteller, wobei die verwendeten Hilfsstoffe auf Cellulosebasis beruhen.

Wie aus Abb. 55 hervorgeht, liegen 84% der untersuchten Präparate in einem Viskositätsbereich zwischen 1 bis 10 cSt. Die restlichen 16% weisen Viskositätswerte bis zu 300 cSt auf, wobei wesentliche Anteile in Bereichen zwischen 3 bis 10 bzw. 20 bis 30 cSt zu finden sind.

kinematische Viskosität (cSt)	Anzahl (%)										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Gesamtzahl											196
1 - 10											164
10 - 20											6
20 - 30											17
30 - 40											1
40 - 50											1
100 - 200											1
200 - 300											6

Abb. 55 Kinematische Viskosität von 196 untersuchten wäßrigen Augentropfen-Fertigarzneimitteln

Über die Hälfte der untersuchten Zubereitungen (57%) weisen keine oder nur sehr geringe Viskositätserhöhung auf, da sie zwischen 1 und 2 cSt liegen.

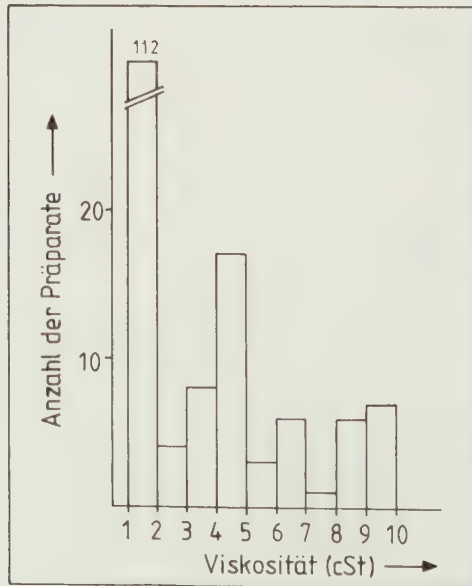


Abb. 56 Viskositätswerte wäßriger Augentropfenpräparate mit einer kinematischen Viskosität zwischen 1 und 10 cSt

2.6 Augentropfenbehältnisse

Da die Stabilität eines Augenarzneimittels in erheblichem Maße von der Eignung der gewählten Verpackung abhängig ist, wurden die vorliegenden wäßrigen Augentropfen-Fertigarzneimittel auch auf das verwendete Augentropfenbehältnis hin überprüft. Wie aus Abb. 57 hervorgeht, waren die Kunststoffbehältnisse mit über 84% das im Jahre 1985 am häufigsten eingesetzte Primärpackmittel.

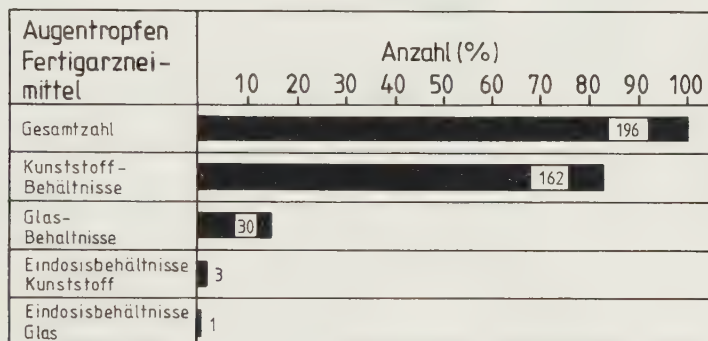


Abb. 57 Augentropfenbehältnisse von 196 untersuchten wäßrigen Augentropfen-Fertigarzneimitteln

Die vom DAB 8 erstmals vorgeschriebene Mengenbegrenzung auf 10 ml wurde in 194 Fällen beachtet. Lediglich 2 Präparate enthielten 15 ml, wobei nach Auskunft des Herstellers die Umstellung der Präparate bevorstand.

Unter den 4 feststellbaren Einzeldosenbehältnissen waren drei Kunststoffbehältnisse gegenüber einem Glasbehältnis vertreten.

2.7 Verfalldaten und Haltbarkeitsdauer

Wäßrige Augenarzneimittel zählen zu den besonders instabilen Pharmaka. Demzufolge müssen verhältnismäßig viele dieser Fertig-arzneimittel wegen ihrer begrenzten Stabilität von weniger als 3 Jahren mit einem Verfalldatum versehen sein. Von den 196 untersuchten Augentropfenpräparaten trugen 125 ein derartiges Verfalldatum.

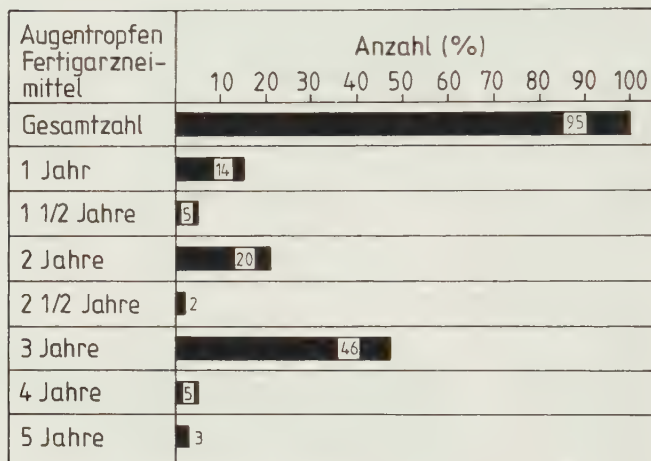


Abb. 58 Haltbarkeitsdauer von 95 untersuchten Augentropfen-Fertigarzneimitteln

Die Abb. 58 zeigt die Haltbarkeitsdauer von 95 Präparaten, bei welchen die Zeitspanne zwischen Herstellung und Verfall^{+) er-}mittelt werden konnte bzw. Angaben zur Haltbarkeitsdauer von den Herstellern gemacht wurden. Wie daraus hervorgeht, waren annähernd 90% der Präparate zwischen 1 bis 3 Jahre haltbar. Die Zahl der Präparate, welche zwischen 3 und 5 Jahre haltbar waren, betrug nur etwa 10%.

3. Untersuchung von Augenwässer-Fertigarzneimitteln

Da die Zahl der auf dem deutschen Markt erhältlichen Augenwässer-Fertigarzneimittel sehr klein ist, konnten nur 7 Präparate in die Untersuchungen einbezogen werden. Das DAB 8 bzw. die Ph. Eur. besitzen bisher noch keine Augenwässer-Monographie. Den Untersuchungen wurde deshalb die Augentropfen-Monographie zugrunde gelegt.

^{+) bestimmt nach Haltbarkeits- und Herstellungsdaten deutscher Arzneimittel, von Schwendinger, J., D. Schaaf, B. Marshall}

3.1 Wirkstoffe

Wie aus Tab. 52 hervorgeht, enthalten die Augenwässer-Zubereitungen keine stark wirksamen und besonders stabilitätsgefährdeten Stoffe. Bemerkenswert ist unter ihnen ein ausgeprägter Anteil an Drogenextrakten.

Präparat	Borsäure	Borax	Salicylsäure	Alantoin	Zinksulfat	Zinkborat	Campher	Naphazolin-HCl	Ethanol	Fenchelöl	Baldrianauszug	Hamamelisauszug	Rosenblätterauszug	Arnikauszug	Augentrostauszug	Kamillenblüttenauszug	Fenchelauszug	Enzianauszug	Malvenauszug	Euphrasiaauszug
A	x		x		x								x							
B	x					x	x	x												
C	x	x	x											x						
D															x	x	x	x	x	
E															x	x	x	x		
F	x								x	x	x									
G	x	x	x	x	x								x							

Tab. 52 Wirkstoffe der untersuchten Augenwässer-Fertigarzneimittel

3.2 Pharmazeutische Qualität von Augenwässern

Augenwässer werden in vergleichsweise großen Volumina von etwa 5 - 10 ml zum Spülen des Auges verwendet. An ihre Verträglichkeit sind deshalb besonders hohe Maßstäbe anzulegen. Die Qualitätsbeurteilung der Augenwässer führte zu folgenden Befunden (Tab. 53):

Sterilität der Zubereitungen war bei allen 8 Präparaten gegeben.

Präparat D enthielt kein Konservierungsmittel. Dieser Befund konnte im qualitativen Hemmhoftest bestätigt werden. 3 Präparate wiesen keine Augenbadewannen als notwendige Applikationshilfen auf.

Präparat	Behältnis	Augen- badewanne	Konservierungs- mittel	pH	Tonizität (mOsmol/kgH ₂ O)	Sterilität
A	Kunststoff- flasche, gelb	ja	Thiomersal	7,00	322	entspricht
B	Kunststoff- flasche, weiß	ja	Chlorbutanol	6,35	450	entspricht
C	Kunststoff- flasche, gelb	ja	Chlorhexidin- diglukonat	7,20	272	entspricht
D	Glasflasche braun	nein	-	4,20	830	entspricht
E	Glasflasche braun	nein	Benzalkonium- chlorid	7,00	306	entspricht
F	Glasflasche braun	nein	Chlorhexidin- diglukonat	5,65	698	entspricht
G	Glasflasche braun	ja	Parabene	7,15	842	entspricht

Tab. 53 Pharmazeutische Qualität von Augenwässern

Für Präparat G wurden die wegen ihrer Reizwirkung am Auge gerade bei Augenwässern als ungünstig einzustufenden Parabene als Konservierungsmittel eingesetzt.

Die Präparate B, D, F sowie G wiesen Tonizitätswerte auf, die erheblich außerhalb des vom Auge tolerierten Bereichs lagen. Bei den Präparaten B, D sowie F wurde dieser ungünstige Standard der Verträglichkeit zusätzlich durch unphysiologische pH-Werte verstärkt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die untersuchten Augenwässer-Fertigarzneimittel teilweise einen verbesserungswürdigen Qualitätsstandard aufwiesen. Dies kann mit dem bisherigen Mangel einer verbindlichen Augenwässer-Monographie in Zusammenhang stehen.

4. Untersuchung homöopathischer Augentropfen-Fertigarzneimittel

1980 hat die Arzneibuchkommission für das Homöopathische Arzneibuch im Rahmen des 1. Nachtrags auch eine Monographie für homöopathische Augentropfen in das HAB 1 aufgenommen. Die Übergangsregelung gestattete das Inverkehrbringen von Arzneimitteln, die nicht dieser Monographie entsprachen, bis zum 31.12. 1983.

Im Jahre 1985 wurden in den vorliegenden Untersuchungen homöopathische Augentropfenpräparate daraufhin geprüft, ob sie der Monographie des HAB 1 entsprachen:

4.1 Konservierungsmittel

Für Mehrdosenbehältnisse fordert auch das HAB 1 den Zusatz eines geeigneten Konservierungsmittels.

Bei 2 der untersuchten 28 Präparate wurde dieser Forderung durch Verwendung bisher üblicher Konservierungsmittel entsprochen (Abb. 59). Bei 18 Präparaten, entsprechend 64%, wurde die Konservierung mit Hilfe oligodynamisch wirkender Silbermengen durchgeführt.

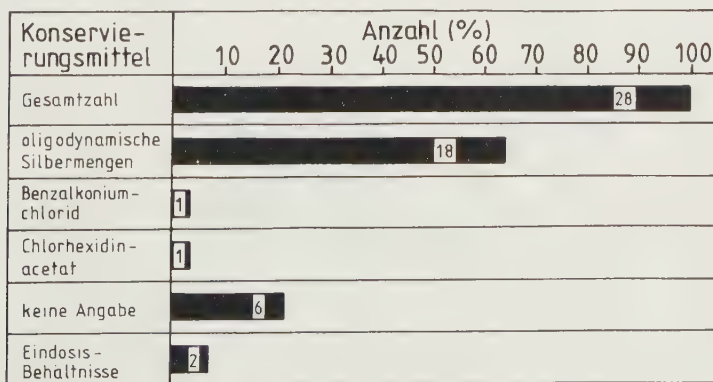


Abb. 59 Konservierungsmittel der untersuchten homöopathischen Augentropfen

Die Anwendung von oligodynamisch wirkenden Silbermengen (117) erfordert eine Änderung des isotonisierenden Zusatzes. Anstelle des vom HAB 1 geforderten Natriumchlorids wurde in allen Fällen Kaliumnitrat eingesetzt. Die Deklarationspflicht dieses Isotonisierungsmittels wurde bei allen Präparaten beachtet. Eine Vermeidung des Zusatzes von Konservierungsmitteln war durch Anwendung von Einzeldosenbehältnissen bei 2 Präparaten festzustellen. 6 Präparate wiesen keine deklarierten Konservierungsmittel auf. Dieses Ergebnis konnte in 4 Fällen durch einen Hemmhofstest bestätigt werden.

4.2 Tonizität

Wie aus Abb. 60 hervorgeht, wird die Forderung nach annähernder Isotonie mit der Tränenflüssigkeit von der Mehrzahl der homöopathischen Augentropfenpräparate erfüllt.

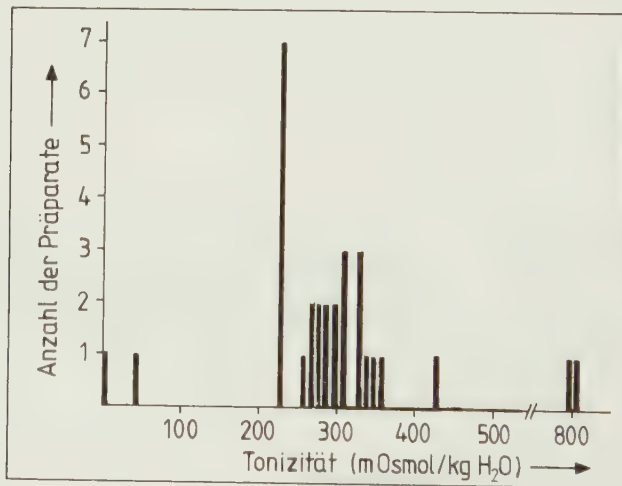


Abb. 60 Tonizitätswerte homöopathischer Augentropfenpräparate

2 Präparate zeigten so niedrige Tonizitätswerte, daß die letzte Potenzierung bei der Herstellung dieser Präparationen mit Sicher-

heit nicht wie vorgeschrieben mit einer isotonischen Lösung vorgenommen wurde. Bei den beiden anderen Präparaten ist die Zahl und Menge der verarbeiteten Wirkstoffe für eine ausgeprägte Hypertonie verantwortlich.

4.3 pH-Werte

Wie die Befunde bei der Untersuchung von homöopathischen Augentropfenpräparaten erkennen ließen (Abb. 61), lag praktisch keines der untersuchten Präparate in dem vom Auge tolerierten pH-Bereich. Ein deutlicher Schwerpunkt war dabei zwischen pH 5,6 bis 6,0.

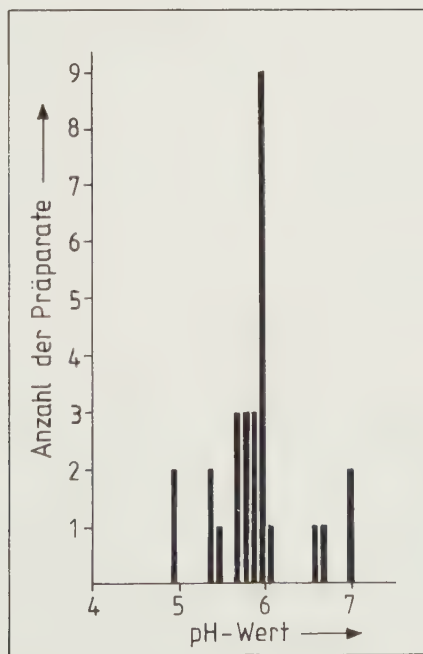


Abb. 61 pH-Werte homöopathischer Augentropfen

5. Untersuchung Öliger Augentropfen

Unter den Augentropfenpräparaten der Roten Liste 1985 stellen die Öligen Augentropfen mit 5,6% einen vergleichsweise kleinen Anteil.

Bei den öligen Augentropfen handelt es sich in der Regel um retardierend wirkende Zubereitungen für die nächtliche Applikation, bei der Einschränkungen der Sehfähigkeit vernachlässigt werden können. Insgesamt überwiegen Mydriatika, entzündungswidrige und antibakteriell wirksame Zubereitungen. Die Art des eingesetzten Öls ist mit der Angabe "pflanzliches Öl" nur vage beschrieben. Bei 3 Präparaten fehlt eine nähere Kennzeichnung vollständig.

Wirkstoffe	Präparat											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Atropin										x		
Bupranolol												x
Chloramphenicol		x		x	x							
Dexamethason			x									
Ethacridin	x					x						
Hydrocortisonhexanoat					x							
Physostigmin									x			
Pilocarpin							x	x	x			
Prednison				x								
(+)-Propyl-O-benzoyl-pseudotropin 2-carboxylat	x											
Retinolpalmitat												x
Konservierungsmittel												
Cetalkoniumchlorid	x	x	x	x		x	x			x	x	
Chlorbutanol								x	x			
keine Angabe					x							x
Öliger Träger												
pflanzliches Öl	x	x	x	x		x	x			x	x	x
keine Angabe					x			x	x			

Tab. 54 Wirkstoffe, Konservierungsmittel und Art der Grundlage bei öligen Augentropfenpräparaten

Eine Messung der kinematischen Viskosität verschiedener pflanzlicher Öle erlaubte Rückschlüsse auf das Trägeröl. Bei den 11 zur Verfügung stehenden Fertigarzneimitteln handelt es sich demnach um Rizinusöl, wie es vom DAB 8 als Träger vorgeschrieben wird (Tab. 55).

Viskosität (cSt)			
Fertigarzneimittel		Trägeröle	
A 1096	H 1093	Rizinusöl	1086
B 1076	I 1024	Olivenöl	94
C 1030	J 1126	Sesamöl	62
D 1068	K 1052	Erdnußöl	285
F 1078	L 1145		
G 1052			

Tab. 55 Kinematische Viskosität von Öligen Augentropfenpräparaten im Vergleich zu verschiedenen pflanzlichen Ölen

6. Diskussion

Als Fazit der Untersuchung von über 200 Augentropfen- bzw. Augenwässer-Fertigarzneimitteln kann festgestellt werden, daß diese Arzneimittel den heutigen Anforderungen an ihre Sicherheit überwiegend entsprechen.

Dies gilt, soweit es überprüft werden konnte, insbesondere für die Sterilität der Zubereitungen, die sowohl bei den 56 Stichproben der wäßrigen Augentropfenpräparate als auch bei allen Augenwässern gegeben war. Bei der Anwendung und Deklaration von Konservierungsmitteln ergibt sich ein fast ähnliches Bild.

Die 11 handelsüblichen Augentropfen-Fertigarzneimittel-Präparate, die keine Deklaration eines Konservierungsmittels aufwiesen, enthielten Antibiotika, mußten daher nicht eigens konserviert

werden. Im Gegensatz dazu muß die Konservierungspflicht bei homöopathischen Augentropfenzubereitungen als noch nicht voll berücksichtigt bezeichnet werden.

Der überwiegende Teil der untersuchten Augentropfenpräparate liegt in einem für das Auge verträglichen Tonizitätsbereich. Die vom Arzneibuch geforderte Einstellung einer annähernden Isotonie wurde damit von den meisten Präparaten soweit erfüllt. Hypertone Lösungen sind in bestimmten Fällen durch therapeutisch erforderliche hohe Wirkstoffkonzentrationen nicht zu vermeiden.

Einen wesentlich ungünstigeren Eindruck vermittelte die Überprüfung der pH-Werte der wäßrigen Augenarzneimittel.

Besonders stark stabilitätsgefährdete Substanzen, wie die Anästhetika Oxybuprocain, Proxymetacain, Tetracain, sowie Mydriatika wie Atropin, Homatropin, Scopolamin und Cyclopentolat, Glaukommittel wie Pilocarpin, Physostigmin, Adrenalin, weisen teilweise sehr stark saure pH-Werte auf.

Von der Möglichkeit, wesentlich besser verträgliche Trockenpräparate zur Vermeidung der Stabilitätsprobleme hydrolyse- und oxidationsgefährdeter Zubereitungen herzustellen, wird aus Kostengründen leider zu selten Gebrauch gemacht.

Bei homöopathischen Zubereitungen lassen sich ungünstige pH-Werte im Bereich von pH 5,6 bis 6 überwiegend auf den Einsatz von Kaliumnitrat als Isotonisierungsmittel zurückführen. Eine 1,6%ige Kaliumnitratlösung weist dabei einen pH-Wert von 5,9 auf. Die Augenwässer besitzen in 3 von 8 Fällen pH-Werte $< 6,5$ und sind gerade unter dem Aspekt der besonderen Verträglichkeitsbedürftigkeit dieser Darreichungsform zu beanstanden.

Zur Viskositätserhöhung von wäßrigen Augentropfenpräparaten dienen vorzugsweise die beiden makromolekularen Hilfsstoffe Hydroxypropylmethylcellulose mit 45% und Polyvinylalkohol mit 15% bei insgesamt 80 viskositätserhöhten Zubereitungen. Unter diesen viskositätserhöhten Zubereitungen finden sich in großer Mehrheit Präparationen mit 2 bis 10 cSt. Eine nicht unerhebliche Zahl weist allerdings auch Viskositätswerte von 10 bis 20 cSt (6) bzw. 20 bis 30 cSt (17) auf. Extrem hohe Werte von 200 bis 300 cSt

waren in 6 Fällen vertreten und können bestimmten therapeutischen Verwendungszwecken zugeordnet werden.

Wie aus der Haltbarkeitsdauer von 95 untersuchten Augentropfen-Fertigarzneimitteln hervorgeht, sind lediglich etwa 10% zwischen 3 und 5 Jahren haltbar. Annähernd 90% der Präparate weisen Haltbarkeitsfristen zwischen 1 und 3 Jahren auf. Dies zeigt deutlich, daß bei wäßrigen Augentropfen-Fertigarzneimitteln deren chemische Instabilität infolge hydrolytischer und oxidativer Abbaureaktionen der Wirkstoffe und Konservierungsmittel ein zentrales Problem der Arzneimittelsicherheit darstellt.

C. Experimenteller Teil

I. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmungen

1. Geräte und Materialien

HPLC-Analysensystem

Fa. Millipore-Waters, Eschborn, bestehend aus zwei Hochdruck-pumpen M 6000 A, der Steuerungseinheit System Controller M 720, dem automatischen Probeneinspritzsystem WISP 710 B, dem Schreiber und Integrator Data Module M 730, dem UV-Festwellenlängen-detektor M 441, dem Radial Compressionssystem RCM 100 sowie dem variablen Wellenlängendetektor UVIDEC-100-III, Fa. Jasco, Japan.

Ultraschallbad Sonorex AK 510; Fa. Bandelin, Berlin

Filtrationseinheit

Pyrex-Ganzglas-Filtrationsgerät; PTFE-Membranfilter 0,5 μ , Typ FH; Fa. Millipore, Bedford, USA

Polycarbonat-Filtrationsgerät; Cellulosenitrat-Membranfilter 0,2 μ ; Fa. Sartorius, Göttingen

Stationäre Phasen

Radial-Pak Si (Kieselgel), Länge 10 cm, ID 8 mm 10 μ -Material

Radial-Pak Si (Kieselgel), Länge 10 cm, ID 8 mm 5 μ -Material

Radial-Pak C₈ (reversed-phase), Länge 10 cm, ID 8 mm 10 μ -Material

Radial-Pak C₁₈ (reversed-phase), Länge 10 cm, ID 8 mm 10 μ -Material

Fa. Millipore-Waters, Eschborn

Hibar Fertigsäule RT 250-4 LiChrosorb® RP-18, 10 μ m

Hibar Fertigsäule RT 250-4 LiChrosorb® RP-18, 5 μ m

Hibar Leerrohr mit Muffe zur direkten Kopplung (Vorsäule)

Perisorb RP-18

Perisorb RP-8

Perisorb A

Fa. Merck, Darmstadt

Mobile Phasen

Acetonitril LiChrosolv[®] für die Chromatographie

Methanol LiChrosolv[®] für die Chromatographie

ortho-Phosphorsäure p.a.

Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei p.a.

Natriumdihydrogenphosphat · 2 H₂O p.a.

Fa. Merck, Darmstadt

PIC-Reagenz B-8 = Octansulfonsäure in Puffer pH 3,5

PIC-Reagenz B-7 = Heptansulfonsäure in Puffer pH 3,5

PIC-Reagenz B-6 Low-UV = Hexansulfonsäure in Puffer pH 3,5

PIC-A-Reagenz = Tetrabutylammoniumphosphat in Puffer pH 7,5

Fa. Millipore-Waters, Eschborn

Dibutylamin p.a.

Fa. Sigma, St. Louis, USA

Konservierungsmittel/Arzneistoffe

Die Verbindungen entsprachen jeweils den Qualitätsanforderungen der Arzneibücher

4-Chlorphenylethylalkohol; Fa. Aldrich, Milwaukee, USA

Cialit^{® +)}, Timerfon^{® +)}; Fa. Asid Veterinär GmbH, München

N-Cetylpyridiniumchlorid B.P.; Fa. Caelo, Hilden

Benzalkoniumchlorid

Benzylalkohol puriss.p.a.

p-Chloranilin p.a.

2-Phenylethylalkohol purum

Thiosalicylsäure puriss.p.a.

β,β,β-Trichlor-tert.-butylalkohol purum

Fa. Fluka AG, Buchs, Schweiz

Benzalkon B (Dodigen 1509)^{+) +)}

Cetrimoniumbromid (Dodigen 5594)^{+) +)}

Fa. Hoechst AG, Frankfurt

^{+) +)} Wir danken diesen Firmen für die Konservierungsmittel.

Chlorhexidindiacetat B.P.C.⁺⁾

Chlorhexidindiglukonat B.P.C. 20% Lsg.⁺⁾

Chlorhexidindihydrochlorid B.P.⁺⁾

Fa. ICI-Pharma, Plankstadt

Aceton p.a.

Benzoessäure puriss. p.a.

Benzaldehyd puriss. p.a.

Dithiosalicylsäure purum

Ethylenglykolmonophenylether

Phenyllessigsäure p.a.

Fa. Merck, Darmstadt

Phenylacetaldehydlösung 50% in Benzylalkohol

Fa. Riedel-de Haen, Seelze

Benzethoniumchlorid (Hyamine 1622)⁺⁾

Fa. Röhm und Haas, Frankfurt

Ethylmercuri-thiosalicylsäure-Na-Salz pharm., mind. 97% (NF)

Fa. Serva, Heidelberg

Cetalkoniumchlorid (Tetraseptan®)⁺⁾

Fa. Winzer, Konstanz

Phenylquecksilberacetat⁺⁾

Phenylquecksilberborat⁺⁾

Phenylquecksilbernitrat⁺⁾

Fa. Zyma AG, München

Benzalkoniumchlorid USP-Referenz-Standard

Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Eschborn

Benzalkoniumchlorid

Fa. Synopharm, Hamburg

Benzalkoniumchlorid

Fa. Aldrich-Chemie, Steinheim

^{+) Wir danken diesen Firmen für die Konservierungsmittel.}

2. Durchführung der Bestimmungen

Herstellung der Eluenten

Zur Herstellung der Fließmittel wurden die wäßrigen Phasen über Cellulosenitrat-Membranfilter (Porengröße 0,22 μ), die organischen Phasen über PTFE-Membranfilter (Porengröße 0,5 μ) filtriert. Der organischen Phase wurde vor der Behandlung im Ultraschallbad (30 Minuten) 10% Wasser oder wäßrige Phase zugesetzt.

Praktische Ausführung

Organische und wäßrige Phase wurden von getrennten Pumpen gefördert und erst am Pumpenausgang in einer Mischkammer vereinigt. Dies ermöglichte ein rasches Verändern der Chromatographiebedingungen bei Temperaturschwankungen, Säulenveränderungen usw..

Beim Zumischen von 10% Wasser oder wäßriger Phase zur organischen Phase konnte eine bessere Durchmischung und damit eine konstante Basislinie erzielt werden. Pumpe A förderte die organische Phase, Pumpe B die wäßrige.

Alle hier vorgestellten HPLC-Bestimmungen erfolgten bei Raumtemperatur und ohne Säulentemperierung.

Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die quantitative Bestimmung der Arzneistoffe erfolgte nach der Methode des externen Standards durch je fünfmalige Injektion von Standardlösungen sowie Einpunkteichung und Calibrierung über den Integrator. Nach der Analyse von maximal 10 Proben wurde durch erneute fünfmalige Standardinjektion recalibriert. Die Auswertung der Meßsignale erfolgte über eine Peakflächenbestimmung durch den Integrator.

2.1 Stabilitätsspezifische Bestimmung von alkoholischen Konservierungsmitteln

Chromatographische Parameter: siehe Tab. 2

Phosphatpuffer pH 7,2 : 10 mMol KH_2PO_4 390 Teile
10 mMol Na_2HPO_4 610 Teile

Papiervorschub : 1 cm/min

2.2 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Guanidin-Konservierungsmitteln

Chromatographische Parameter: siehe Tab. 4

Pumpe B : 1 Fläschchen PIC-Reagenz B-7 auf 1000 ml Wasser
+ 10 mMol KH_2PO_4 eingestellt mit Phosphorsäure
auf pH 3,5

Papiervorschub : 1 cm/min

2.3 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Konservierungsmitteln vom Typ quartäres Ammoniumsalz

Chromatographische Parameter: siehe Tab. 6

Trennsystem 2/Pumpe B : $\text{m}/15$ KH_2PO_4 990,5 Teile
 $\text{m}/15$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9,5 Teile

Papiervorschub : Trennsystem 1: 1 cm/min
Trennsystem 2: 0,25 cm/min
Trennsystem 3: 1 cm/min

2.4 Stabilitätsspezifische Bestimmung von Konservierungsmitteln vom Typ Organoquecksilberverbindung

Chromatographische Parameter: siehe Tab. 9

Trennsystem 1/Pumpe B : 1 Fläschchen PIC A-Reagenz auf
1000 ml Wasser

Trennsystem 2/Pumpe B : 1 Fläschchen PIC-Reagenz B-6
Low-UV auf 1000 ml Wasser, eingestellt mit H_3PO_4 auf pH 2,0

Papiervorschub : 1 cm/min

3. Errechnung von Kapazitätsfaktoren, relativer Retention und Auflösung

Kapazitätsfaktoren k' , relative Retention α und Auflösung R sind wichtige chromatographische Parameter zur Charakterisierung einer HPLC-Trennung (118).

Der k' -Wert bezeichnet das Verhältnis der Aufenthaltszeiten einer Substanz in der stationären und mobilen Phase und berechnet sich aus der Retentionszeit t_R der Substanz und der Totzeit t_0 der Trennsäule:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Die relative Retention α ist ein Maß für die Selektivität eines Trennsystems und berechnet sich aus dem Verhältnis der Kapazitätsfaktoren zweier getrennter Substanzen:

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad \text{für } k_2' > k_1' .$$

Da eine hohe relative Retention bei unsymmetrischer Peakform nicht notwendigerweise mit einer Trennung der Substanzen bis zur Basislinie verbunden ist, wird die Güte eines Chromatogramms außerdem durch die Angabe der Auflösung R charakterisiert. R läßt sich aus der Differenz der Retentionszeiten und dem arithmetischen Mittel der Basisbreiten w berechnen:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} .$$

Zur quantitativen Analyse genügt eine Auflösung $R > 1,25$. Sehr große Auflösungen führen zu unerwünscht hohen Analysenzeiten (13).

II. Entwicklung einer mikrobiologischen Methode zur Analytik von Konservierungsmitteln in Augentropfen

1. Agardiffusionstest

Geräte

Biologische Testschale mit den Abmessungen 243x243 mm und 18 mm Höhe; Fa. Nunc, Wiesbaden
Duran Weithalsflasche 250 ml mit autoklavierbarem Schraubdeckel; Fa. Schott, Mainz
Automatisch arbeitender Autoklav ST 5000 mit Vorvakuum; Fa. Stiefenhofer, München
Wasserbad Typ 3047; Fa. Köttermann, Uetze-Hänigsen
Trockenschrank UL 40; Fa. Memmert, Schwabach
Brutschrank; Fa. Ehret, Emmendingen/Kohlmarsreute Baden
Korkbohrer ϕ 8 mm;
Digital anzeigende Schublehre digit E 2056; Fa. Helios, Niedernhall/Württ.
Nivelliertische; Eigenbau

Eppendorf Varipette 4710 10-100 μ l mit Original Eppendorf Pipettenspitzen, gelb, 100 μ l
Eppendorf Varipette 4710 100-1000 μ l mit Original Eppendorf Pipettenspitzen, blau, 1000 μ l
Fa. Eppendorf Gerätebau, Nürnberg

Reagenzgläser AR-Glas, starkwandig
Kapsenberg-Kappen

Materialien

Natriumtetraborat $\cdot$ 10 H_2O , Ph.Eur.
Antibiotika-Agar Nr. 5 Merck Nr. 5271
Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei p.a.
Dinatriumhydrogenphosphat-1-hydrat p.a.
Fa. Merck, Darmstadt

Borsäure, crist. Ph. Eur.; Fa. Caesar & Loretz, Hilden
Bacillus subtilis ATCC 6633 Sporensuspension; Fa. Difco, USA bezogen über Fa. Otto Neuwald, Hamburg
Bacillol; Fa. Bode, Hamburg

Alle weiteren beim Agardiffusionstest eingesetzten Arznei- und Hilfsstoffe entsprachen der Arzneibuchqualität bzw. den Spezifikationen der Hersteller.

Durchführung der Bestimmung

Zur Bereitung des Nährmediums in einer Schichtdicke von 4 mm wurden 5,4 g Antibiotika-Agar Nr. 5 und 212 g demineralisiertes Wasser in ein autoklavierbares Duran Weithalsgefäß eingewogen.

Nach der Autoklavierung wurde das Gefäß entnommen und 15-20 Minuten in einem Wasserbad auf 60°C temperiert. Der noch flüssige Agar wurde mit 1 ml einer 10^7 Sporen enthaltenden Lösung beimpft und in die auf dem Nivelliertisch stehende Testschale ausgegossen. Anschließend erfolgte eine jeweils halbstündige Aufbewahrung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank.

In den fertigen, erstarrten Agar wurden mit Hilfe eines abgeflammt Korkbohrers nach einem randomisierten Schema 36 Stanzlöcher gebohrt und der ausgestochene Agar entfernt.

In diese Stanzlöcher wurden mit einer Eppendorfpipette 100 µl Eich- bzw. Testlösung eingebracht. Die Eichlösung wurde dabei aus einer Stammlösung durch 1+1 Verdünnung hergestellt.

Nach einer durchschnittlichen Bebrütungszeit von 16 h wurden die Hemmhöfe mit einer digital anzeigenden Schublehre ausgemessen und nach dem Randomisierungsschema zugeordnet. Der Mittelwert der 3 zueinandergehörenden Hemmhofdurchmesser wurde in einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die Konzentration aufgetragen.

Nach Beendigung des Tests wurden die Testschalen mit Desinfektionslösung eingesprüht. Nach dem Spülen waren sie wieder einsetzbar.

2. Einflußfaktoren auf den Agardiffusionstest von Konservierungsmitteln

Ziel einer Optimierung beim Agardiffusionstest ist das Erreichen möglichst flacher Eichgeraden. Unter Einbeziehung der vier wichtigsten Augentropfen-Konservierungsmittel wurden durch gezielte Veränderung einzelner Parameter die besten Bedingungen zur Durchführung des Agardiffusionstests ermittelt.

Als erstes wurde die Schichtdicke des Agar verändert. Zu diesem Zweck wurde dieselbe Verdünnungsreihe auf einen Agar mit 4 mm und einen solchen mit 2 mm Schichtdicke aufgetragen.

Die 4 untersuchten Konservierungsmittel zeigten ähnliches Verhalten. Wie aus Abb. 62 am Beispiel des Thiomersals ersichtlich ist, ergaben sich bei 2 mm zwar größere Hemmhöfe, aber eine eher steilere Eichgerade.

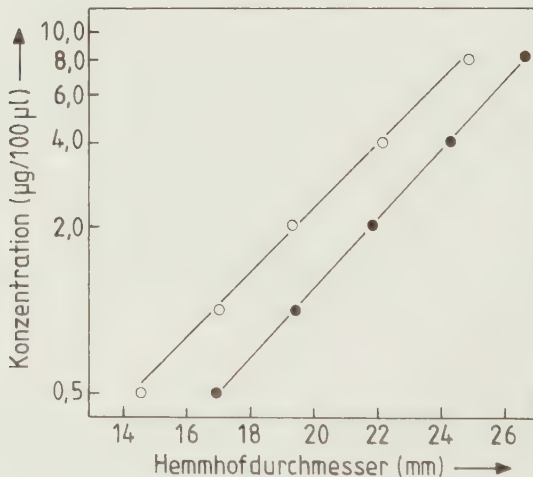


Abb. 62 Einfluß unterschiedlicher Schichtdicke auf den Agardiffusionstest von Thiomersal

-●- 2 mm

-○- 4 mm

Als nächster Einflußfaktor wurde die Einsaatdichte untersucht. Es wurden Testplatten mit 10^5 , 10^6 und 10^7 Sporen pro ml Agar eingesetzt. Bei der niedrigsten Einsaatdichte wurden die größten Hemmhöfe erzielt. Diese waren allerdings unscharf und deshalb schwer auszumessen. 10^7 Sporen/ml erbrachten annähernd parallel verschobene Geraden zur Einsaatdichte 10^6 Sporen/ml. Allerdings waren die Hemmhofränder noch schärfer und erlaubten ein besseres Auswerten.

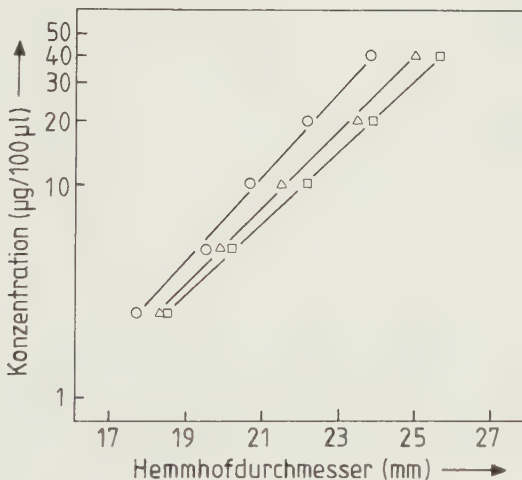


Abb. 63 Einfluß der Bebrütungstemperatur auf den Agar-diffusionstest von Benzalkoniumchlorid

-□- 31°C -△- 34°C -○- 37°C

Ein weiterer in die Untersuchungen einbezogener Faktor war die Bebrütungstemperatur.

Dieselbe Verdünnungsreihe wurde auf 3 verschiedene Platten aufgetragen, welche dann bei 31°C, 34°C und 37°C für 16 h bebrütet wurden.

Wie am Beispiel Benzalkoniumchlorid aus Abb. 63 ersichtlich ist, resultiert aus einer Bebrütungstemperatur von 31°C die

günstigste Eichgerade mit den größten Hemmhöfen. Durch die Verringerung der Bebrütungstemperatur setzt das Keimwachstum etwas langsamer ein und das Konservierungsmittel kann länger diffundieren. Bei den vier untersuchten Konservierungsmitteln wurde gleiches Verhalten beobachtet.

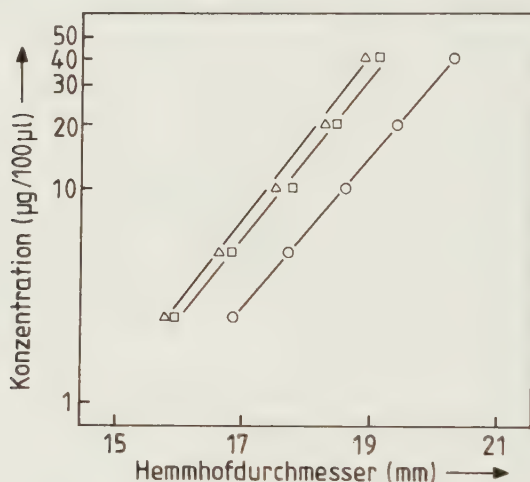


Abb. 64 Einfluß der Vordiffusion auf den Agardiffusionstest von Chlorhexidindiacetat

- △- ohne Vordiffusion
- 1/2 h Vordiffusion
- 1 h Vordiffusion

Das Ergebnis aus den Untersuchungen mit unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen veranlaßte uns, den Einfluß einer Vordiffusion auszutesten.

Es wurden dazu drei identische Platten erstellt. Eine von diesen kam sofort nach dem Auftragen in den Brutschrank. Die beiden anderen wurden vor der Bebrütung 1/2 h bzw. 1 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Bebrütungszeit betrug je Platte 16 h, die Bebrütungstemperatur 31°C.

Das Ergebnis zeigt am Beispiel des Chlorhexidindiacetats Abb.64 Die Vordiffusion von 1/2 h führt gegenüber der Platte ohne Vordiffusion zu geringfügig größeren Hemmhöfen und einer etwas flacheren Geraden. Bei einstündiger Vordiffusion sind die Hemmhöfe deutlich vergrößert und die Steilheit der Geraden vermindert. Das Verhalten der einbezogenen Konservierungsmittel war dabei annähernd gleich.

3. Einfluß des pH-Wertes

Geräte und Materialien/Durchführung

siehe C.II.1

pH-Meter, Typ E 632, mit kombinierter Mikro-pH-Glaselektrode mit Diaphragma Typ Z für kleinere Probenvolumina; Fa. Metrohm, Filderstedt.

Pufferlösungen

pH-Wert	Citronensäure 19,2g/l	Dinatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O 35,6g/l	Essigsäure 12g/l T in 500ml	Natriumacetat 16,4g/l T in 500ml	Kaliumdihydrogenphosphat 9,08g/l	Dinatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O 11,88g/l	Bor-säure 26,5g/l	Borax 26,5g/l
3,0	79,5 T	20,5 T	-	-	-	-	-	-
4,5	-	-	140 T	110 T	-	-	-	-
6,0	-	-	-	-	87,7 T	12,3 T	-	-
7,5	-	-	-	-	16,4 T	83,6 T	-	-
9,0	-	-	-	-	-	-	150 T	850 T

Tab. 56 Pufferlösungen für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit des Agardiffusionstests von Konservierungsmitteln

4. Einfluß von Wirk- und Hilfsstoffen

Geräte und Materialien

siehe C.II.1

Durchführung

Aus den in Tab. 13 und 14 angegebenen Wirk- und Hilfsstoffen wurde jeweils mit destilliertem Wasser eine Lösung hergestellt. Die Konzentration entsprach dabei dem in den Tabellen angegebenen höchsten Prozentsatz.

Eine Testschale wurde mit beimpftem (10^7 Sporen/ml) Agar ausgegossen und 36 Stanzlöcher eingebracht. In diese wurden 100 µl Wirk- oder Hilfsstofflösung einpipettiert, wobei jede Lösung 3x aufgetragen wurde. Nach sechzehnständiger Bebrütung bei 31°C wurde auf entstandene Hemmhöfe geprüft.

Zeigten der Wirk- oder Hilfsstoff einen Hemmhof, so wurde folgendermaßen verfahren:

Der pH-Wert der Wirk- oder Hilfsstofflösung wurde bestimmt und ein Puffer, vorzugsweise Phosphatpuffer, mit dem ermittelten pH-Wert bereitet. Anschließend wurden zwei Verdünnungsreihen hergestellt. Bei der ersten wurde das Konservierungsmittel im Puffer gelöst und mit Pufferlösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Bei der zweiten Reihe wurde das Konservierungsmittel in die Arzneistofflösung eingewogen und mit dieser im Verhältnis 1:1 schrittweise gemischt.

Beide Verdünnungsreihen wurden auf eine gemeinsame Testplatte aufgebracht. Die Bebrütungsdauer betrug 16 h, die Temperatur 31°C. Nach dem Ausmessen wurden die Werte zugeordnet und die beiden Eichgeraden verglichen.

In den Abb. 65 bis 68 wird exemplarisch am Beispiel der vier wichtigsten Augentropfen-Konservierungsmittel und dem Hilfsstoff Borsäure eine solche Austestung dargestellt.

Wie den Abbildungen zu entnehmen, verursacht die Borsäure nur bei Chlorhexidindiacetat eine Veränderung der Eichgeraden. Bei den anderen Konservierungsmitteln besitzt sie keinen Einfluß.

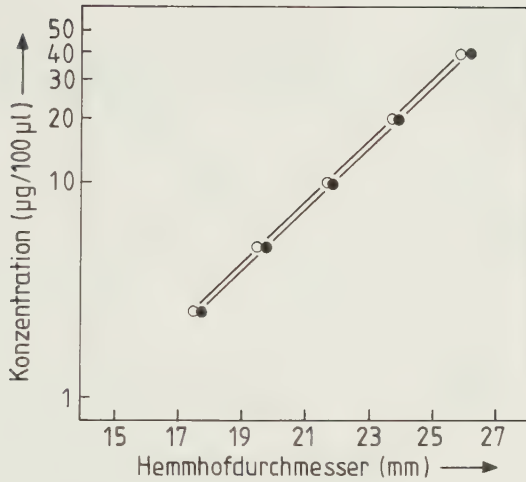


Abb. 65 Einfluß von Borsäure auf den Agardiffusions-
test von Benzalkoniumchlorid

-○- Benzalkoniumchlorid in Puffer pH 5,0
-●- Benzalkoniumchlorid in 1,9% Borsäurelösung

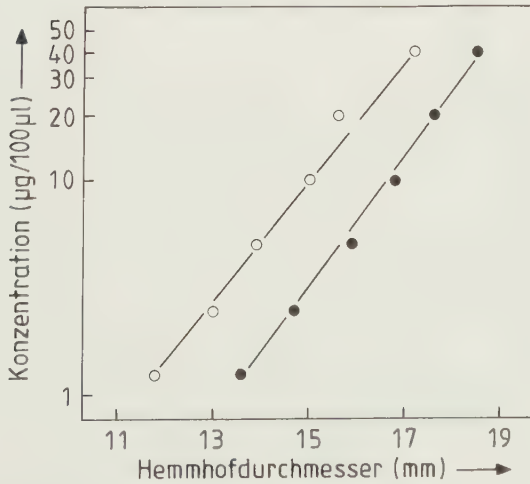


Abb. 66 Einfluß von Borsäure auf den Agardiffusions-
test von Chlorhexidindiacetat

-○- Chlorhexidindiacetat in Puffer pH 5,0
-●- Chlorhexidindiacetat in 1,9% Borsäurelösung

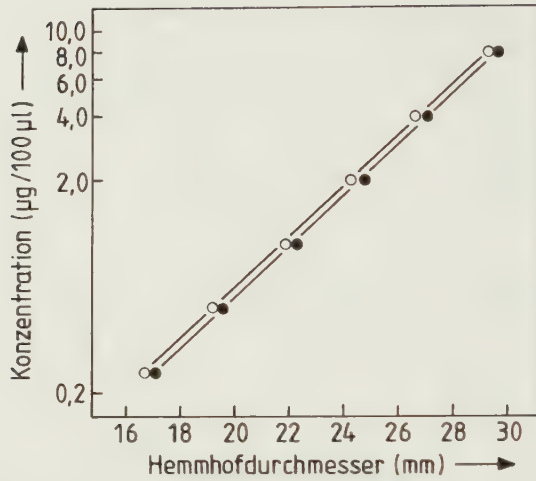


Abb. 67 Einfluß von Borsäure auf den Agardiffusions-
test von Phenylquecksilberborat

-○- Phenylquecksilberborat in Puffer pH 5,0
-●- Phenylquecksilberborat in 1,9% Borsäurelösung

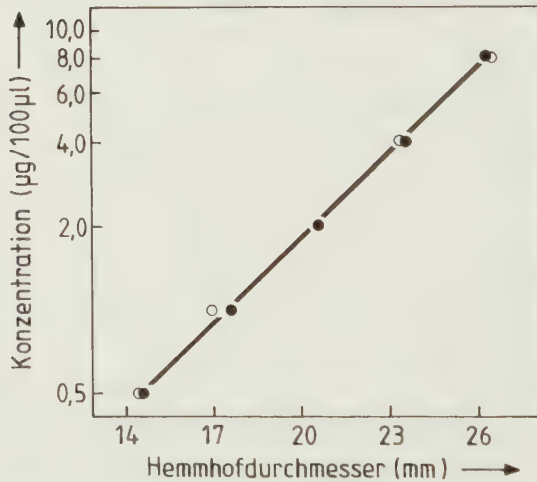


Abb. 68 Einfluß von Borsäure auf den Agardiffusions-
test von Thiomersal

-○- Thiomersal in Puffer pH 5,0
-●- Thiomersal in 1,9% Borsäurelösung

III. Beeinflussung der Stabilität und Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln durch die Herstellung von Augentropfen

Konservierungsmittel und Substanzen: siehe C.I.

1. Beeinflussung durch die Entkeimungsfiltration

Geräte und Materialien

Sterile Einmalfilter:

OptexTM Einweg-Filterereinheit vom Typ Millex für die Sterilfiltration ophthalmischer Lösungen, steril, 0,22 µm; Fa. Wepa, Höhr-Grenzhausen

Minisart SM 165 29 K Einwegfiltrationseinheit, steril, 0,22 µm; Fa. Sartorius, Göttingen

Rotrand FP 030/3 Einmalfilter, steril, 0,2 µm; Fa. Schleicher & Schüll, Dassel

Glasspritze Inaltera Supra 10 ml; Fa. Henke-Sass-Wolf, Tuttlingen
Destillationsgerät, Muldestor; Fa. Wagner & Munz, München

Durchführung

Die entsprechende Menge des jeweiligen Konservierungsmittels wurde in frisch destilliertem Wasser gelöst. 10 ml dieser Lösung wurden in die Glasspritze aufgesaugt. Nach Anbringen des Einmalfilters wurden die Fraktionen 0-2 ml, 4-6 ml und 8-10 ml separat aufgefangen und ohne weitere Verdünnungsschritte der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Analyse unterzogen. Die Fraktionen 2-4 ml und 6-8 ml wurden verworfen.

Als Standard diente die unfiltrierte Lösung.

Die aufgeführten Gehalte ergeben sich als Mittelwert der Bestimmungen an 4 verschiedenen Filtern des gleichen Typs.

2. Beeinflussung durch die Hitzesterilisation

Geräte und Materialien

Weißglasampullen 10 ml; Fa. Oson-Glaswarenfabrik & Export,
Volkach-Main

Fa. Remy & Geiser KG, Anhausen:

Aponorm II-/Zentrop-Augentropfengläser DIN 18, braun, rund,
10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Aponorm II-/Zen-
trop-Tropfaggregat DIN 18, bestehend aus

- Lochkappe, rot, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX
der Fa. BASF
- Gummiteil aus Silikonkautschuk, transparent
- Überkappe, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX
der Fa. BASF

Destillationsgerät, Muldestor; Fa. Wagner & Munz, München
Automatisch arbeitender Autoklav ST 5000 mit Vorvakuum;

Fa. Stiefenhofer KG, München

Sterikon®-Bioindikator; Fa. Merck, Darmstadt

Browne Sterilisationskontrollröhrchen Typ 1 für Autoklaven;

Fa. Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Durchführung

In Ampullen und Augentropfengläschen wurden jeweils 10 ml der
entsprechenden Konservierungsmittellösung abgefüllt.

Nach dem Zuschweißen der Ampullen wurden die beiden Behältnis-
arten in einem Drahtkörbchen in den Autoklaven verbracht. Die
Sterilisation erfolgte bei 121°C und 20 Minuten oder 110°C und
30 Minuten.

Nach Beendigung der Sterilisation, welche durch Bioindikatoren
und Farbindikatoren kontrolliert wurde, erfolgte eine Prüfung
der Ampullen auf Dichtigkeit im Blaubad.

Die Gehaltsbestimmung wurde hochdruckflüssigkeitschromatogra-
phisch und z.T. auch mikrobiologisch durchgeführt.

Die angegebenen Werte ergeben sich als Mittelwerte von 4 ver-
schiedenen Gefäßen.

Als Standard der Bestimmung diente nicht autoklavierte Konser-
vierungsmittellösung.

3. Beeinflussung durch verschiedene Packmittel

Geräte und Materialien

Fa. Remy & Geiser KG, Anhausen:

Aponorm II-/Zentrop-Augentropfengläser DIN 18, braun, rund, 10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Aponorm II-/Zentrop-Tropfaggregat DIN 18, bestehend aus:

- Lochkappe, rot, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX der Fa. BASF
- Gummiteil aus Silikonkautschuk, transparent
- Überkappe, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF

Zentrop-Augentropfengläser/neue Ausführung, braun, rund, 10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Zentrop-Augentropferverschluß DIN 18, bestehend aus:

- Lochkappe Nr. 1801, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX der Fa. BASF
- Gummiteil aus Silikonkautschuk, transparent
- Kugeltropferkanüle, natur, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF
- Verschlußhütchen, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF

Retro-Augentropfengläser DIN 18/neue Ausführung, braun, rund, 10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Retro-Augentropferverschluß DIN 18, bestehend aus:

- Lochkappe Nr. 1802/R, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX der Fa. BASF
- Gummiteil blau, aus Chlorbutylkautschuk
- Verschlußhütchen, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF

Retro-Augentropfengläser DIN 18/neue Ausführung, braun, rund, 10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Retro-Augentropferverschluß DIN 18, bestehend aus:

- Lochkappe Nr. 1802/R, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX der Fa. BASF
- Gummiteil, rot, aus Naturkautschuk
- Verschlußhütchen, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF

Fa. Stella KG Werner Deussen, Eltville:

Stella Flaschenpipetten®-Serie 660, bestehend aus:

- Rollrandflasche braun, hydrolytische Klasse I, 10 ml
- Pipetten/natur aus Novolen® der Fa. BASF
- Kappen mit anhängendem Sicherungsring/weiß, aus Polypropylen

Fa. Raku GmbH, Verpackungswerke, Rastatt:

Raku Tropfflasche aus ND-PE Lupolen 1810 E Fa. BASF mit 3% Titandioxid, weiß, 10 ml mit Tropfer aus ND-PE Lupolen 1810 H Fa. BASF und Verschuß ND-PE Stamylen HD 7031 Fa. DSM Deutschland GmbH & Co.

Raku Tropfflasche aus ND-PE Lupolen 1810 E Fa. BASF, natur, 10 ml mit Tropfer aus ND-PE Lupolen 1810 H Fa. BASF und Verschuß ND-PE Stamylen HD 7031 Fa. DSM Deutschland GmbH & Co.

Durchführung

10 ml der entsprechenden Konservierungsmittellösung wurden in vier identische Augentropfenfläschchen abgefüllt.

Die Lagerung erfolgte in umgekehrter Stellung, d.h. die Fläschchen wurden auf dem Kopf stehend bei 20°C im Klimaraum gelagert. In bestimmten Abständen wurden durch Austropfen Proben in WISP-Mikroprobengläschen der Fa. Waters entnommen.

Die Bestimmung erfolgte hochdruckflüssigkeitschromatographisch, wobei die angegebenen Werte die Mittelwerte der Einzelbestimmungen der 4 Behältnisse sind.

4. Beeinflussung durch isotonisierende Zusätze

4.1 Durchführung der Versuche

Geräte und Materialien

Enghalsschraubdeckelflaschen, Braunglas 100 ml; Glaswerk Wertheim, Wertheim

Kühlschrank; Fa. AEG

Grund- und Hilfsstoffe

Natriumacetat, wasserfrei p.a.

Natriumchlorid, p.a.

Kaliumnitrat, p.a.

Borsäure, p.a.

Natriumdihydrogenphosphat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, p.a.

Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p.a.

Natriumtetraborat $\cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, p.a.

Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, p.a.

Fa. Merck, Darmstadt

Isotonische Lösungen

Natriumchlorid 0,9%

Kaliumnitrat 1,6%

Borsäure 1,9%

Borsäure-Borax-Puffer pH 7,5

Borsäure 1,9% 8,5 T

Borax 2,65% 1,5 T

Phosphatpuffer pH 7,25

Natriumdihydrogenphosphat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 2,65% 2 T

Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, 1,85% 8 T

Natriumacetat, wasserfrei 1,3%

Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 2,15%

Durchführung

Die Herstellung der isotonischen Konservierungsmittellösungen erfolgte auf 2 Methoden:

Methode I - Einwiegemethode:

Die isotonische Lösung wurde vorgelegt. Das jeweilige Konservierungsmittel wurde als Festsubstanz darin gelöst.

Methode II - Stammlösungsmethode:

Aus Konservierungsmittelsubstanz und destilliertem Wasser wurde eine Stammlösung bestimmter Konzentration bereitet. Diese Lösung wurde dann in kleinen Anteilen der jeweiligen isotonischen Lösung beigegeben.

Die Lagerung der nach beiden Methoden hergestellten Lösungen erfolgte bei 20°C im Klimaraum und bei 4°C im Kühlschrank. Die Proben wurden in bestimmten Abständen mit Hilfe einer Lupe auf Niederschläge untersucht und einer hochdruckflüssigkeits-chromatographischen Gehaltsbestimmung unterzogen.

4.2 Infrarotspektroskopische Untersuchungen

Geräte und Materialien

Perkin Elmer 257 Grating Infrared Spectrophotometer und Linsen-Mikro-Illuminator 036929; Fa. Bodenseewerke Perkin Elmer & Co., Überlingen

Durchführung der Messungen

Die durch Filtration isolierten Niederschläge wurden sorgfältig mit destilliertem Wasser nachgewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Nach Verreibung mit Kaliumbromid wurden sie in einer Spezialform bei hohem Druck zu Tabletten gepreßt. Anschließend wurden Infrarotspektren aufgenommen.

Für den Niederschlag in isotonischer Natriumchloridlösung war dazu ein Mikro-IR-Spektrum unter Einsatz des Linsen-Mikro-Illuminators nötig.

4.3 Dünnschichtchromatographische Messungen

Geräte und Materialien

Standard-Trennkammer; Fa. Desaga GmbH, Heidelberg

Desaga Min UVIS; Fa. Desaga GmbH, Heidelberg

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 20x20 cm; Fa. Merck, Darmstadt

Einmal-Mikropipetten 10 µl intra END; Fa. Brand GmbH & Co., Wertheim

Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄

Fließmittel: Chloroform / Methanol / Ammoniak (25%)
60 30 10

Detektion: Unter UV bei 254 nm und

Besprühen mit einer Dithizonlösung (0,05g/100 ml)

Auftragmenge: Jeweils 20 µl der betreffenden Lösung

IV. Stabilität und Dosierungsgenauigkeit von Konservierungsmittel-Stammlösungen bei der Herstellung von Augentropfen

1. Durchführung der Stabilitätsversuche

Geräte und Materialien

Trockenschrank TV 30u; Fa. Memmert, Schwabach

Enghalsschraubdeckelflaschen, Braunglas (100 ml); Fa. Glaswerk Wertheim, Wertheim

Kautex® Weichpolyethylenflaschen; Fa. Kremer und Kreiler, München

Grund- und Hilfsstoffe: siehe C.I.1.

Durchführung

Von den jeweiligen Konservierungsmittellösungen wurden 100 ml in zwei Braunglasenghalsschraubdeckelflaschen oder in Weichpolyethylenflaschen gegeben. Diese wurden gut verschlossen und im Klimaraum bei 20°C sowie in Trockenschränken bei 30, 40, 50, 60 und 70°C unter Lichtausschluß gelagert.

Nach den angegebenen Zeiten erfolgte eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Gehaltsbestimmung.

1.1 Stabilität von Benzalkoniumchlorid- und Phenylquecksilberborat-Stammlösungen in Glasflaschen

Wie in Tab. 57 und 58 dargestellt, konnte für eine 0,487% Benzalkoniumchlorid-Stammlösung sowie eine 0,1% Phenylquecksilberborat-Stammlösung in den angegebenen Belastungszeiten selbst bei 70°C keine Gehaltsabnahme festgestellt werden.

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)						
	0	1	2	4	8	12	21
20°C	100,28	100,27	100,43	100,64	100,98	100,14	99,87
30°C	100,15	100,47	100,26	100,06	100,29	100,21	100,42
40°C	100,34	100,38	100,47	100,05	100,61	99,89	99,47
50°C	100,14	100,21	100,68	100,69	100,53	100,20	99,28
60°C	100,08	100,09	100,52	100,63	100,30	100,28	100,06
70°C	100,21	100,99	100,89	100,95	100,21	100,12	100,0

Tab. 57 Stabilität einer 0,487%, wäßrigen, ungepufferten Benzalkoniumchlorid-Stammlösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von Belastungsdauer und -temperatur

Temperatur	Belastungsdauer (Wochen)				
	0	2	4	12	22
20°C	99,98	100,50	100,54	100,48	100,32
30°C	100,05	100,44	100,12	100,32	100,67
40°C	100,16	100,58	100,65	100,51	100,52
50°C	100,08	100,41	100,67	100,32	100,41
60°C	100,10	100,52	100,60	100,47	100,44
70°C	100,03	100,51	100,36	100,21	100,23

Tab. 58 Stabilität einer 0,1%, wäßrigen, ungepufferten Phenylquecksilberborat-Stammlösung in Glasflaschen in Abhängigkeit von Belastungsdauer und -temperatur

2. Dosierungsgenauigkeit von Konservierungsmittel-Stammlösungen

Geräte und Materialien

Die Tropfgeräte wurden über den Laborbedarfshandel bezogen.

Normaltropfenzähler Marke Assistent

Normaltropfenzähler nach Ph. Eur. I

Pipettenflasche 10 ml, Braunglas

Tropfpipette Glas mit Gummihütchen

Aponorm® Augentropfenflasche (siehe C.III.3.)

2.1 Bestimmung des Tropfgewichts

Zur Bestimmung des Tropfgewichts wurden die verwendeten Tropfgeräte zuerst sorgfältig gereinigt, gut nachgespült und im Trockenschrank getrocknet.

Anschließend wurden 20 Tropfen frisch destilliertes Wasser von 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) aus dem senkrecht gehaltenen Tropfgerät mit einer gleichmäßigen Abtropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde frei in ein austariertes Wägegglas abgetropft und das Gewicht der 20 Tropfen ermittelt.

Aus den Gewichten von 15 verschiedenen Exemplaren des gleichen Tropfgeräts wurde die Standardabweichung errechnet.

In gleicher Weise wurden die Konservierungsmittellösungen gehandhabt.

Bei den grenzflächenaktiven Substanzen Benzalkoniumchlorid und Chlorhexidindiacetat wurde in gleicher Weise die Anzahl an Tropfen der Stammlösung bestimmt, welche zum Erreichen eines Gewichts von 1000 mg (± 50 mg) nötig war.

2.2 Bestimmung des Gehalts von Konservierungsmitteln nach Tropfdosierung

Geräte und Verfahren: siehe C.I.1.

Konservierungsmittel: siehe C.I.1.

Durchführung

Ein 10 ml Meßkolben wurde zur Hälfte mit destilliertem Wasser gefüllt. In denselben wurde mit Hilfe eines senkrecht gehaltenen Normaltropfenzählers bei gleichbleibender Abtropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde die nötige Tropfenzahl einer Stammlösung dosiert. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Die so hergestellte Lösung wurde ohne weitere Behandlung einer hochdruckflüssigkeitschromatographischen Analyse unterworfen.

V. Untersuchungen zur Frage der Haltbarkeit von Augentropfen während der Anwendung

1. Stabilität von Adrenalin-Präparaten während der Anwendung

Geräte und Materialien

OptexTM Einweg-Filtereinheit vom Typ Millex für die Sterilfiltration ophthalmischer Lösungen, steril, 0,22 µm; Fa. Wepa, Höhr-Grenzhausen

Fa. Remy & Geiser KG, Anhausen:

Aponorm II-/Zentrop-Augentropfengläser DIN 18, braun, rund, 10 ml, Glas der hydrolytischen Klasse I mit Aponorm II-/Zentrop-Tropfaggregat DIN 18, bestehend aus:

- Lochkappe, rot, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 1100 LX der Fa. BASF
- Gummiteil aus Silikonkautschuk, transparent
- Überkappe, weiß, gespritzt, aus Polypropylen, Typ 9200 HX der Fa. BASF

Destillationsgerät, Muldestor; Fa. Wagner & Munz, München
Hochdruck-Kleinststerilisator, Typ K 9 l; Keller Apparatebau, Weinheim

Eppendorf Varipette 4710 10-100 µl mit Original Eppendorf
Pipettenspitzen, gelb, 100 µl; Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Grund- und Hilfsstoffe

Adrenalinatartrat, Ph. Eur.; Fa. Synochem, Hamburg
Ascorbinsäure, Ph. Eur.; Fa. Bayer, Leverkusen
Borsäure, crist., Ph. Eur.; Fa. Caesar & Loretz, Hilden
Natriumpyrosulfit purum p.a.; Fa. Fluka, Buchs, CH
Natriumtetraborat·10 H₂O, Ph. Eur.; Fa. Merck, Darmstadt
Phenylquecksilberborat; Fa. Zyma AG, München
Phenylquecksilbernitrat; Fa. Zyma AG, München
Ethylmercuri-thiosalicylsäure-Na-Salz pharm., mind. 97% (NF);
Fa. Serva, Heidelberg
Kaliumhydroxychinolinsulfat, Fa. Synochem, Hamburg
Stickstoff, nachgereinigt; Fa. Linde AG, Höllriegelskreuth

Hergestellte Rezepturen

Im folgenden sind Herstellungsangaben der Codices bzw. Rezeptsammlungen, soweit erforderlich, wiedergegeben.

Wenn Sterilfiltration gefordert war, erfolgte diese mit Optex Einmalfiltern. Als Behältnisse wurden Aponorm[®]-Augentropfenflaschen eingesetzt.

1. Neutrale Adrenalin-Augentropfen DAC 79

Adrenalin	1,00 g
Borsäure	1,20 g
Borax	0,30 g
Natriumdisulfit	0,30 g
Kaliumhydroxychinolinsulfat	0,05 g
Phenylquecksilberborat	0,002g
Wasser für Injektionszwecke	ad 100,00 g

Phenylquecksilberborat, Kaliumhydroxychinolinsulfat, Natriumdisulfit, Borsäure und Borax werden in 50 g Wasser für Injektionszwecke unter Aufkochen gelöst. Nach dem Erkalten wird das Adrenalin unter Begasung mit sauerstofffreiem Stickstoff gelöst. Die Lösung wird mit Wasser für Injektionszwecke zu 100,0 g ergänzt und unter Ausschluß von Licht und Luft unter aseptischen Bedingungen in sterilisierte Behältnisse filtriert (Entkeimungsfiltration nach DAB 8, Anhang B).

2. Oculoguttae Adrenalini neutrales 1% FNA

Adrenalini tartras	1,82 g
Acidum ascorbicum	0,20 g
Borax	2,95 g
Natrii pyrosulfis	0,30 g
Solutio phenylhydrargiri 40 mg/l	ad 100,00 ml

Aseptische Arbeitsweise:

Löse das Borax unter Erwärmen in der Phenylquecksilberborat-Lösung. Löse in der abgekühlten Lösung nacheinander Natriumpyrosulfit, Ascorbinsäure und Adrenalintartrat. Kontrolliere und notiere den pH-Wert.

Sterilisation:

Filtriere durch einen in einem Plastikfilterhalter befindlichen sterilen Membranfilter von 0,22 µm. Notiere den Bubble-point.

Verpackung:

Sterile Augentropfenverpackung von höchstens 10 ml Inhalt, welche den Inhalt vor Lichteinfluß schützt.

3. Oculoquittae Epinephrini 2. AB-DDR

Epinephrinbitartrat	1,8 g
Thiomersal	0,002g
Borsäure	0,15 g
Natriumpyrosulfit	0,3 g
Natriumtetraborat	1,6 g
Wasser	zu 100,0 g

Die Borsäure wird in 80,0 g Wasser unter Erhitzen gelöst. In der auf 20°C abgekühlten Lösung werden das Thiomersal, das Natriumtetraborat, das Natriumpyrosulfit und das Epinephrinbitartrat gelöst. Die Lösung wird mit Wasser zu 100,0 g ergänzt und unter Durchführung einer Sterilfiltration in sterile Behältnisse abgefüllt.

4. Oculoquittae Adrenalin 1% Disp. Dan. 1963 Add.

I.	Phenylhydrargyri nitras	0,01 g
	Acidum boricum	12,0 g
	Aqua purissima sterilisata	800,0 g
II.	Natrii pyrosulfis	0,6 g
	Adrenalin bitartras	18,2 g
III.	Aqua purissima sterilisata	q.s.

I herstellen unter Erwärmen. Nach Erkalten II in I lösen und III hinzufügen bis 1000 g. Dann kann man wärmebehandeln bei 100°C 20 Minuten im geschlossenen Behältnis.
Farblose bis schwach gelbliche Flüssigkeit; schwach saure Reaktion.

Bemerkung: Es wurde eine Wärmebehandlung im Autoklaven bei geöffnetem Haupthahn im strömenden Wasserdampf durchgeführt.
Dauer: 20 Minuten.

Durchführung der Versuche

Die hergestellten Rezepturen und die vorhandenen Fertigarzneimittel wurden bei 20°C im Klimaraum gelagert.

2x täglich wurden 2 Tropfen in senkrechter Stellung mit dem Tropfer nach unten abgetropft.

Nach Bestimmung eines Anfangsgehaltes wurde nach 2, 4 sowie 5 Wochen ebenfalls eine Gehaltsbestimmung durchgeführt.

Stabilitätsspezifische hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung von Adrenalin

Bei dem angegebenen Trennverfahren handelt es sich um ein von THOMA und STRUVE publiziertes (119) und nur geringfügig verändertes Verfahren.

Stationäre Phase: Rad-Pak C₁₈, 5 µ, Fa. Waters

Mobile Phase : Pumpe A: Methanol + 10% Wasser

Pumpe B: ein Fläschchen PIC B 8-Reagenz auf
1 l Wasser; Einstellung eines pH-Wertes von
2,0 mit Phosphorsäure

Pumpe A : Pumpe B = 32 : 68

Durchfluß : 2,0 ml/min

Druck : 1800-2000 psi

Einspritzvolumen: 65 µl / 0,16 a.u.f.s.

Wellenlänge : 280 nm

Papiervorschub : 1 cm/min

Eingesetzte Geräte und Fließmittel: siehe C.I.1.

Durchführung

Zur Untersuchung der Adrenalin-Fertigarzneimittel sowie der Rezepturen aus Vorschriftensammlungen wurden diese auf einen Gehalt von 100 µg/ml Adrenalinbase mit stickstoffbegastem Wasser verdünnt und direkt eingespritzt.

Die quantitative Erfassung des Adrenalinserfolgte durch Erstellung einer Eichkurve mit mindestens 5 Meßpunkten.

Den Ergebnissen liegen Vierfachbestimmungen zugrunde.

Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde durch zehnmalige Injektion von Standardlösungen überprüft. Es besitzt eine relative Standardabweichung von 1,7%. Die Retentionszeiten betrugen 4-5 Minuten.

2. Stabilität von Konservierungsmitteln während der Anwendung

Geräte und Materialien: siehe C.III.3.

Konservierungsmittel : siehe C.I.1.

Hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung: siehe C.I.2.

Mikrobiologische Bestimmung: siehe C.II.

Durchführung

10 ml der entsprechenden Konservierungsmittellösung wurden in 4 Augentropfenfläschchen der gleichen Marke abgefüllt.

Diese Augentropfenfläschchen und die untersuchten Fertigarzneimittel wurden im Klimaraum bei 20°C gelagert. 3x täglich wurden in senkrechter Stellung mit dem Tropfer nach unten 2 Tropfen abgetropft.

Zu den Zeiten 0, 2, 4 sowie 6 Wochen wurden WISP-Mikroproben-
gläschen durch Austropfen durch die Tropfeinrichtung mit Konservierungsmittellösung gefüllt und ohne weitere Behandlung direkt chromatographiert.

VI. Untersuchungen zur pharmazeutisch-technologischen Qualität von flüssigen Ophthalmika-Fertigarzneimitteln

1. Bestimmung der Tonizität

Gerät

Elektronisches Halbmikro-Osmometer Typ M mit 0,15 ml Proben-
volumen; Fa. Knauer, Oberursel

Durchführung der Bestimmung

Nach Eichung des Gefrierpunkt-Osmometers mit destilliertem Wasser und einer 400 mOsmol-Eichlösung wurden 0,15 ml der zu untersuchenden Lösung mit Hilfe einer Meßpipette in das trockene Probengefäß gebracht und die Tonizität bestimmt.

Für jedes Präparat wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

2. Bestimmung des pH-Wertes

Gerät

pH-Meter, Typ E 632, mit kombinierter Mikro-pH-Glaselektrode mit Diaphragma Typ Z für kleine Probenvolumina; Fa. Metrohm, Filderstedt

Durchführung der Bestimmung

Der pH-Wert wurde bei den Augentropfen und Augenwässern direkt in der Zubereitung bestimmt, da die gewählte Mikro-Glaselektrode ein direktes Einführen in die Behältnisse ermöglichte.

3. Bestimmung der Viskosität

Geräte

Fa. Schott-Geräte GmbH, Hofheim a.Ts.:

Mikro-KPG[®]-Ostwald-Viskosimeter mit Konstanten von 0,01 bis 10 KPG[®]-Hilfspipette

Temperiermantel mit Halterungsplatte für Viskosimeter nach Ostwald

Umwälz-Thermostat N3-B; Fa. Haake Mess-Technik GmbH, Karlsruhe
Stoppuhr Hanhart Amigo; Fa. Hanhart, Villingen-Schwenningen

Durchführung der Messungen

Die Fertigarzneimittel wurden bei 20°C im Umwälz-Thermostaten vorgewärmt.

Zur Ermittlung der am besten geeigneten Viskosimeter-Kapillar-Nummer wurde ein Teil der Lösung zuerst in die KPG[®]-Hilfspipette abgefüllt. Durch den Tropfenfall in bestimmten Zeitabständen konnte das Viskosimeter mit einer geeigneten Konstante nach einer Liste der Firma Schott ausgewählt werden. Durchflußzeiten unter 30 sec wurden möglichst vermieden.

Exakt 2 ml wurden mit Hilfe einer Vollpipette in das trockene Viskosimeter eingefüllt. Dieses wurde dann mit Hilfe einer Halterungsplatte in einen Temperiermantel eingebracht.

Daraufhin folgte eine fünfminütige Temperierzeit. Anschließend wurde die Prüf Flüssigkeit mit Hilfe eines Peleusballs über die obere Meßmarke hochgesaugt und die Durchflußzeit zwischen den beiden angebrachten Meßmarken mit Hilfe einer Stoppuhr gemessen. Die Durchflußzeit wurde als Mittelwert von 3 Messungen ermittelt.

Die im Ergebnisteil angegebenen Viskositäten wurden als Produkt aus Durchflußzeit und Viskosimeterkonstante erhalten.

4. Überprüfung der Sterilität

Geräte

Fa. Sartorius, Göttingen:

Polycarbonat-Filtrationsgerät für Unterdruck 47 mm, 250 ml
Zellulosenitratfilter, 0,45 µm, 47 mm

Pyrex-Enghalsflasche 100 ml; Fa. Sovirel, France

Duran-Weithalsflasche mit autoklavierbarem Schraubverschluß,
100 ml, 250 ml und 1 l; Fa. Schott, Mainz

Brutschrank; Fa. Ehret, Emmendingen/Kolmarsreute, Baden

Grund- und Hilfsstoffe

L-Cystin, Merck-Nr. 2837

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon USP XX, Merck-Nr. 5459

Flüssiger Thioglykolat-Nährboden, Merck-Nr. 8191

Sabouraud-Glucose 2%-Bouillon, Merck-Nr. 8339

Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei p.a.

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat p.a.

Pepton aus Casein tryptisch verdaut, Merck-Nr. 7213

Fa. Merck, Darmstadt

Epikuron® 100 P1; Fa. Meyer, Hamburg

Polysorbat 80; Fa. Atlas Chemie, Essen

Durchführung des Sterilitätstests

Vor Beginn des Tests wurden Geräte, Filter, Nähr- und Verdünnungslösungen sowie die inaktivatorhaltige Waschflüssigkeit einem geeigneten Sterilisationsverfahren unterzogen.

Die eingelegte Filtermembran wurde mit 100 ml einer 0,1%igen Caseinpepton-Lösung vorbefeuchtet. Die zu untersuchenden Fertig-arzneimittel wurden äußerlich desinfiziert und ihr gesamter Inhalt sofort filtriert.

Anschließend wurde 3x mit je 100 ml inaktivatorhaltigem, isotonem, peptonhaltigem Phosphatpuffer nachgewaschen. Nach Dritteln des Filters mit einer abgeflamten Schere wurden die einzelnen Teilstücke in drei Nährmedien überführt.

Caso- und Thioglykolat-Bouillon wurden bei 30-35°C, Sabouraud-Glucose-Bouillon bei 20-25°C 7 Tage lang bebrütet.

Die Prüfung auf Wachstum erfolgte makroskopisch.

Als Inaktivatoren haben sich bewährt:

0,1% Cystin für Thiomersal und die Phenylquecksilbersalze, 3% Tween 80 und 0,3% Lecithin für die quartären Ammoniumverbindungen.

5. Untersuchung ölicher Augentropfen

Geräte und Materialien: siehe C.VI.4.

Grund- und Hilfsstoffe

Rizinusöl; Deutsche Rizinus-Ölfabrik Boley & Co., Uerdingen,
Niederrhein

Fa. Caelo, Hilden: Olivenöl, Sesamöl, Erdnußöl

D. Z u s a m m e n f a s s u n g

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der chemischen und physikalischen Stabilität von Konservierungsmitteln bei der Herstellung und Lagerung von Augenarzneimitteln. Ferner wurden Stabilitätsprobleme bei der Anwendung durch den Patienten bei Adrenalin und zahlreichen Konservierungsmitteln untersucht.

Als Bestimmungsmethoden dienten dafür entwickelte, stabilitätsspezifische, hochdruckflüssigkeitschromatographische Verfahren sowie ein quantitatives mikrobiologisches Verfahren auf der Basis eines Agardiffusionstests, das ebenfalls für die Durchführung dieser Untersuchungen erarbeitet wurde.

Zur Ermittlung der Einflußfaktoren, welche die Verfügbarkeit von Konservierungsmitteln während der Herstellung von Augentropfen beeinträchtigen, wurden 16 Konservierungsmittel auf die Einflußnahme der Sterilfiltration sowie der Methoden der Hitzesterilisation überprüft.

Bei 10 Augentropfen-Konservierungsmitteln wurden Sorptionsvorgänge an Packmitteln und Tropfvorrichtungen untersucht. Bei Chlorhexidinsalzen und Thiomersal wurden ferner Unverträglichkeiten mit isotonisierenden Zusätzen aufgeklärt.

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der chemischen und physikalischen Stabilität von 5 Adrenalin-Fertigarzneimitteln und 4 Adrenalin-Augenarzneimittelrezepturen sowie 9 Konservierungsmittellösungen unter simulierten Anwendungsbedingungen innerhalb der Aufbrauchsfrist des Arzneibuchs, sowie mit der Stabilität von Konservierungsmittel-Stammlösungen.

Die pharmazeutische Qualität von 196 wäßrigen, 28 homöopathischen, 12 öligen Augentropfen und 7 Augenwässern wurde unter dem Gesichtspunkt der Arzneimittelsicherheit von Ophthalmika nach den Anforderungen der Arzneibücher überprüft.

Im wesentlichen ergaben sich folgende Befunde:

1. Für augentropfenübliche Konservierungsmittel konnten flüssigkeitschromatographische Bestimmungsmethoden mit UV-Detektion entwickelt werden.

Bei alkoholischen Konservierungsmitteln war dies nach dem Prinzip der reversed-phase-Chromatographie auf Octadecylsilan-Säulen als stationärer Phase möglich.

Die Ionenpaar-Chromatographie mit Alkylsulfonsäure bzw. quartären Aminen als Ionenpaarreagenzien und einer Octadecylsilan-Säule als stationärer Phase erwies sich als geeignet für Chlorhexidinsalze und Organoquecksilberverbindungen.

Stationäre Kieselgelphasen unter Zusatz eines organischen Amins zum polaren, wäßrigen Eluenten konnten zur Bestimmung quartärer Ammoniumverbindungen herangezogen werden.

2. Durch einen Hemmhoftest mit *Bacillus subtilis* als Testkeim konnte für 10 Konservierungsmittel mit Ausnahme der Alkohole ein Verfahren erarbeitet werden, welches die quantitative Erfassung der antimikrobiellen Substanzen neben Wirk- und Hilfsstoffen in Fertigarzneimitteln ermöglicht. Das mikrobiologische Verfahren lieferte Gehaltswerte, welche mit denjenigen der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmungsmethoden Übereinstimmung zeigten. Bei Thiomersal konnten Unterschiede erfaßt werden, die auf die antimikrobielle Wirkung der Zersetzungsprodukte zurückzuführen sind.
3. Konservierungsmittelverluste durch Sorption an Filtermaterialien bei der Sterilfiltration sind von der Filtrationsmenge, dem Filtermaterial sowie vom Filterdurchmesser abhängig. Die absorbierte Menge ist ferner abhängig von den Eigenschaften des jeweiligen Konservierungsmittels. Signifikante Verluste bei den ersten beiden Millilitern Filtrat sind bei der Filtration größerer Mengen vernachlässigbar, dürfen aber bei sehr kleinen Filtrationsmengen nicht außer acht gelassen werden. Die größten Verluste treten mit Celluloseacetatfiltern bei Phenoxyethanol, Cialit® und Phenylquecksilbersalzen auf. Filter vom Mischestertyp binden insbesondere Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid und Cetalkoniumchlorid. Keine Gehaltsverluste konnten bei Thiomersal und Timerfon® beobachtet werden.

4. Die untersuchten Augentropfenkonservierungsmittel sind bei Sterilisation im Autoklaven (121°C/20 min) mit einer Ausnahme stabil. Bei Thiomersal tritt ein Gehaltsverlust von annähernd 80% auf.

Findet eine handelsübliche Augentropfenflasche als Behälter bei der Autoklavierung Verwendung, treten Gehaltsverluste bis zu 10%, bei Cialit® bis zu 90% auf.

5. Silikonkautschuk als Tropfermaterial von Augentropfenflaschen führt zu erheblichen Sorptionsverlusten bei Konservierungsmitteln. Bei Kontakt mit Silikonkautschuk ohne Überwurfkappen tritt bei Chlorbutanol innerhalb von 4 Wochen, bei Phenylethanol innerhalb 69 Wochen ein praktisch 100%iger Verlust durch Permeation ein. Sorptionsverluste von ebenfalls 100% werden bei Lagerung mit Flüssigkeitskontakt zum Silikonkautschuk (umgedrehte Lagerung) auch bei Phenylquecksilberverbindungen in etwa 6 Wochen beobachtet. Bei Benzalkoniumchlorid tritt durch Sorption an Naturgummi in etwa 8 Wochen ein vollständiger Verlust ein.

Die geringste Sorptionsneigung weisen Konservierungsmittel gegenüber Polypropylen und Chlorbutylkautschuk auf. Bei Thiomersal bestehen neben dem Sorptionsvorgang noch zusätzliche chemische Wechselwirkungen mit den Behältermaterialien.

6. Bei Chlorhexidindiacetat tritt durch Wechselwirkung mit isotonisierenden Zusätzen infolge Umsetzung zu schwer löslichen Salzen in 26 Wochen bei Raumtemperatur ein Verlust von über 50% in isotonischer Natriumchloridlösung, von 95% in 1,9%iger Kaliumnitratlösung und von 90% in isotonischem Phosphatpuffer pH 7,25 ein. Auftretende Niederschläge konnten IR-spektroskopisch als Chlorhexidin identifiziert werden.

Thiomersal wird in physiologischer Kochsalzlösung bei 20°C binnen 4 Wochen vollständig zersetzt. Der Abbau kann dünn-schichtchromatographisch verfolgt werden. Bei beiden Substanzen treten die geringsten Verluste in isotonischer Natriumacetatlösung auf.

7. Konservierungsmittel-Stammlösungen dürfen nicht in Kunststoffgefäßen aus Weichpolyethylen gelagert werden, da abhängig von der Temperatur hohe Verluste auftreten. Diese betragen für Chlorbutanol nach 22 Wochen bei 50°C 98%, für Phenylquecksilberborat nach 22 Wochen bei 70°C 22% und für Thiomersal nach 14 Wochen bei 70°C 70%.

In Glasbehältnissen tritt trotz Streßlagerung bei 70°C bei den wäßrigen Konservierungsmittel-Stammlösungen von Phenylquecksilberborat (nach 22 Wochen) und Benzalkoniumchlorid (nach 21 Wochen) keine Gehaltsabnahme ein.

Stammlösungen mit alkoholischen Konservierungsmitteln und Chlorhexidindiacetat besitzen nur eine begrenzte Lagerfähigkeit.

Thiomersal-Stammlösungen erleiden nach 13 Wochen bei 20°C einen Verlust von etwa 5% und sollten deshalb bei Raumtemperatur nicht länger als höchstens 3 Monate gelagert werden.

8. Adrenalin-Fertigarzneimittel und -Rezepturzubereitungen unterschreiten innerhalb einer sechswöchigen Aufbrauchsfrist nach Anbruch unter simulierten Gebrauchsbedingungen bei 20°C überwiegend nicht die Gehaltsgrenze von 90%. Instabilität ist jedoch bei ungeeigneten Primärpackmitteln sowie bei bestimmten Rezepturen zu beobachten. Bei Temperaturen >20°C muß mit ungünstigeren Ergebnissen gerechnet werden. Bessere Stabilität nach Anbruch wird insbesondere durch unphysiologische, stark saure pH-Werte erzielt.
9. Während eines simulierten sechswöchigen Aufbrauchszeitraums treten Konzentrationsänderungen von Konservierungsmitteln bei geeigneten Packmitteln nur in geringem Umfang auf. Sili-kongummitropfer verursachen jedoch im Untersuchungszeitraum Gehaltsverluste bei Chlorbutanol von 90%, bei Phenylethanol von 17%, bei Phenylquecksilberacetat von 55%, sowie bei Thiomersal von 21%. Benzalkoniumchlorid wird durch Naturgummitropfer mit 38% gebunden.

10. Bei 196 untersuchten wäßrigen Augentropfenpräparaten war folgende pharmazeutische Qualität feststellbar:
- Von 56 stichprobenartig herausgegriffenen Zubereitungen waren alle steril. Benzalkoniumchlorid, Thiomersal und Chlorbutanol fanden am häufigsten als Konservierungsmittel Verwendung. Etwa zwei Drittel der Präparate wiesen gut verträgliche Tonizitätsbereiche von 225 bis 430 mOsmol auf. Nur 15% der Augenarzneimittel waren auf einen reizlosen pH-Bereich von 7,9 bis 9,7 eingestellt.
- Die Viskosität betrug bei 57% der untersuchten Zubereitungen zwischen 1 bis 2 cSt und bei 16% über 10 cSt. Höhere Viskositätswerte standen auch im Zusammenhang mit bestimmten therapeutischen Erfordernissen.
- Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im allgemeinen die Qualitätsnormen des Deutschen Arzneibuches eingehalten wurden. Erhebliche Abweichungen ergaben sich bei der Verträglichkeit durch die sehr große Anzahl stark sauer eingestellter Präparate.

E. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- (1) MEYER, R.C.
J. Pharm. Sci. 69, 1148 (1980)
- (2) MARSH, D.F. und L.T. TAKAHASHI
J. Pharm. Sci. 72, 521 (1983)
- (3) COLLINS, A.J., A.T. CAMPBELL und R. BAIN
J. Clin. Pharm. 4, 205 (1979)
- (4) STUBER, B. und K.H. MÜLLER
Pharm. Acta Helv. 55, 171 (1980)
Pharm. Acta Helv. 56, 344 (1981)
- (5) MEYER, R.C. und L.B. COHN
J. Pharm. Sci. 67, 1636 (1978)
- (6) MEAKIN, B.J. und Z.M. KHAMMAS
J. Pharm. Pharmacol. 30, Suppl 52P (1978)
- (7) READER, M.J. und C.B. LINES
J. Pharm. Sci. 72, 1406 (1983)
- (8) VALENTOUR, J.C. und J. SUNSHINE
Z. Rechtsmed. 77, 61 (1975)
- (9) SMITH, H. und I. THORPE
J. Chromatogr. 134, 178 (1977)
- (10) MINYARD, J.P., J.H. TUMLINSON, A.C. THOMPSON und
P.A. HEDIN
J. Chromatogr. 29, 88 (1967)
- (11) LINDEMANN, C.J. und A. ROSALIA
J. Pharm. Sci. 58, 118 (1969)
- (12) NEURATH, G. und W. LUETTICH
J. Chromatogr. 34, 253 (1968)
- (13) MEYER, V.
Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
Diesterweg und Salle Frankfurt a.M., Berlin, München 1984

- (14) PATWA, N.V. und L. HUYCK
J. Amer. Pharm. Assoc. N.S.6 372 (1966)
- (15) NAIR, A.R. und J.L. LACH
J. Amer. Pharm. Assoc. 48, 390 (1959)
- (16) VAN DER MAEDEN, F.P.B., P.T. VAN RENS und F.A. BUYTENHUYTS
J. Chromatogr. 142, 715 (1977)
- (17) KNOX, J.H. und J. JURAND
J. Chromatogr. 142, 651 (1977)
- (18) POLACK, A.E.
Austr. J. Pharm. 48, 64 (1967)
- (19) GOODALL, R.R., J. GOLDMANN und I. WOODS
Pharm. J. 200, 33 (1968)
- (20) SOKOLOWSKI, A. und K.G. WAHLUND
J. Chromatogr. 189, 299 (1980)
- (21) TWITCHETT, P.J. und A.C. MOFFART
J. Chromatogr. 111, 149 (1975)
- (22) COOKE, N.H.C. und K. OLSEN
J. Chromatogr. Sci. 18, 512 (1980)
- (23) BIDLINGMEYER, B.A., J.K. DEL RIOS und J. KORPI
Anal. Chem. 54, 442 (1982)
- (24) DREYER, B.
GIT Fachz. Lab. 3, 49 (1983)
- (25) NAHUM, A. und C. HORVATH
J. Chromatogr. 203, 53 (1981)
- (26) KLAAS, E.B., C. HORVATH, W.R. MELANDER und A. NAHUM
J. Chromatogr. 203, 65 (1981)
- (27) THOMA, K., H. AIGNER und B. MERK
unveröffentlicht

- (28) KUSS, H.-J. und M. NATHMANN
Arzneim.-Forsch. 28, 1301 (1978)
- (29) CROMMEN, J.
J. Chromatogr. 186, 705 (1979)
- (30) SVENDSEN, H. und T. GREIBROKK
J. Chromatogr. 212, 153 (1981)
- (31) HANSEN, S.H.
J. Chromatogr. 209, 203 (1981)
- (32) HANSEN, S.H., P. HELBOE, M. THOMSEN und K. LUND
J. Chromatogr. 210, 453 (1981)
- (33) FLANAGAN, R.J., G.C.A. STOREY, R.K. BHAMSA und J. JANE
J. Chromatogr. 247, 15 (1982)
- (34) RICHARDS, R.M.E. und L.M. MIZRAHI
J. Pharm. Sci. 67, 380 (1978)
- (35) LÜDTKE, E. und R. POHLOUDEK-FABINI
Pharmazie 32, 625 (1977)
- (36) R. DOLDER und F.S. SKINNER
Ophthalmika
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1983
- (37) NELSON, J.
in "GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents",
Teil 2, K. TSUJI, Ed. Dekker, New York 1978
- (38) WALLHÄUSER, K.H.
Ärztli. Lab. 16, 305 (1970)
- (39) LINGNAU, J.
Acta Pharm. Technol. 23, 39 (1977)
- (40) WALLHÄUSER, K.H.
Pharm. Ind. 34, 23 (1972)
- (41) SKINNER, F.S.
APV Informationsdienst 18, 256 (1972)

- (42) ULLMANN, E.
APV Informationsdienst 17, 177 (1971)
- (43) NÜRNBERG, E.
Pharm. Ztg. 119, 849 (1974)
- (44) ULLMANN, E.
Acta Pharm. Technol. 23, 137 (1977)
- (45) WALLHÄUSER, K.H.
Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1984
- (46) VAN OOTEGHEM, M. und H. HERBOTS
Pharm. Acta Helv. 44, 602 (1969)
- (47) NAIDOO, N.T., T.J. MCCARTHY und C.H. PRICE
Pharm. Weekblad 105, 1373 (1970)
Pharm. Weekblad 106, 509 (1971)
- (48) ECKERT, Th., A.M. IBRAHIM und H.J. FUNCKE
Pharm. Acta Helv. 48, 628 (1973)
- (49) Pharmazeutisches Taschenbuch
7. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1976
- (50) SKALETZKI, B. und H. WOLLMANN
Pharmazie 28, 1 (1973)
- (51) CHRISTENSEN, K. und E. DAUV
J. Mond. Pharm. 12, 5 (1969)
- (52) BIRNER, J. und R. GARNET
J. Pharm. Sci. 53, 1424 (1964)
- (53) ERIKSSON, K.
Acta Pharm. Suecica 4, 261 (1967)
- (54) NEUWALD, F. und G. SCHMITZEK
J. Pharm. Ind. 29, 875 (1967)

- (55) McCARTHY, T.J.
Pharm. Weekblad 105, 557 (1970)
Pharm. Weekblad 105, 1139 (1970)
- (56) BLACKBURN, H.D., A.E. POLACK und M.S. ROBERTS
J. Pharm. Pharmacol. 90, 666 (1978)
- (57) ROBERTS, M.S., A.E. POLACK, G. MARTIN und H.D. BLACKBURN
Int. J. Pharm. 2, 295 (1979)
- (58) GOSS, J., P. GREGERSEN und A.E. POLACK
Amer. J. Hosp. Pharm. 25, 348 (1968)
- (59) GONZALES, M.A., J. NEMATOLLAHI, W.L. GUESS und J. AUTIAN
J. Pharm. Sci. 56, 1288 (1967)
- (60) SCHOENWALD, R.D. und P.F. BELCASTRO
J. Pharm. Sci. 58, 930 (1969)
- (61) FOKKENS, J. und E. BUURMANN
Pharm. Weekblad 104, 177 (1969)
- (62) DOLBY, J., B. GUNNARSSON, L. KRONBERG und H. WIKNER
Pharm. Acta Helv. 47, 615 (1972)
- (63) JASPERSEN, H.P.
Schweiz. Apoth.-Ztg. 107, 160 (1969)
- (64) TSUJI, K., K. YAMAWAKI und Y. MIYAZAKI
Arch. Pract. Pharm. 24, 110 (1964)
- (65) BIRNER, J. und J.R. GARNET
J. Pharm. Sci. 53, 1266 (1964)
- (66) WIENER, J.
J. Pharm. Pharmacol. 7, 118 (1955)
- (67) POHLOUDEK-FABINI, R. und E. MARTIN
Pharmazie 36, 683 (1981)
- (68) OELSCHLÄGER, H. und R. CANENBLEY
Pharm. Ztg. 128, 1166 (1983)

- (69) LÜDTKE, E., H. DARSOW und R. POHLOUDEK-FABINI
Pharmazie 32, 99 (1977)
- (70) STOCK, B.H.
Aust. J. Pharm. 46, 535 (1965)
- (71) FÜRST, W., G. VALZ, H. GRIGOROW und S. HOFFMANN
Zbl. Pharm. 116, 279 (1977)
- (72) SENIOR, N.
J. Soc. Cosmet. Chem. 24, 259 (1973)
- (73) ANDERS, B. und B. WIEDEMANN
Pharm. Ztg. 130, 1648 (1985)
- (74) HEARD, D.D. und R.W. ASHWORTH
J. Pharm. Pharmacol. 20, 505 (1968)
- (75) CLARK, A.M.
Leserzuschrift an Lancet i.i. 661 (1971)
- (76) HOWORKA, K. und B. und R. MEYER
Pharmazie 28, 136 (1973)
- (77) HOWORKA, K. und B. HOWORKA
Pharmazie 28, 59 (1973)
Pharm. Ztg. 125, 562 (1980)
- (78) STOCK, W. und U. KLAUS
Pharm. Ztg. 127, 733 (1982)
- (79) KREEVOY, M.M.
J. Amer. Chem. Soc. 83, 626 (1961)
- (80) DESSY, R.E. und F.E. PAULIK
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1812 (1963)
- (81) LÜDTKE, E. und R. POHLOUDEK-FABINI
Pharmazie 32, 625 (1977)
- (82) STRECKER, A.
Liebig's Ann. Chem. 32, 75 (1854)

- (83) WEINBERG, J., A. DONESCU und M. OLTEANU
Rev. Rom. Chim. 25, 189 (1980)
- (84) HESS, H.
Pharm. Acta Helv. 39, 721 (1964)
- (85) BÖHME, H. und H. HARTKE
Kommentar zum Europäischen Arzneibuch
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1976
- (86) MEIER, A., H. HAGER und K. MÜNZEL
Pharm. Acta Helv. 31, 177 (1956)
- (87) MURPHY, J.T., H.F. ALLEN und A.B. MANGIARACINE
Arch. Ophthalmol. 53, 63 (1955)
- (88) McRAE, J.D.
Amer. J. Pharm. Educ. 30, 53 (1966)
- (89) ANDERSON, R.A.
Austr. J. Pharm. 48, 309 (1962)
- (90) JIRA, Th., E. ASSMANN und R. POHLOUDEK-FABINI
Pharmazie 34, 442 (1979)
- (91) MARKHAM, M.C. et al.
J. Amer.Chem. Soc. 80, 5394 (1958)
- (92) JAMINET, Fr. et al.
Pharm. Acta Helv. 45, 60 (1970)
- (93) POLLACK, A.E.
Austr. J. Pharm. 48, 64 (1967)
- (94) DAVIES, G.E. et al.
Brit. J. Pharmacol. 9, 192 (1954)
- (95) ROTH, L. und M. DAUNDERER
Giftliste , Ecomed Verlagsgesellschaft 1986
- (96) PINZAUTI, S. und M. CASINI
Il Farmaco Ed. Pract. 35, 92 (1980)

- (97) LINDE, O.K.
Pharm. Ztg. 119, 2033 (1974)
- (98) LEPKE, H.
Dtsch. Apoth. Ztg. 76, 1198 (1931)
- (99) HAMANN, J.
Pharm. Verfahrenstechnik heute 1, 29 (1981)
- (100) HÖFLING, G.
Augenspiegel 27, 186 (1981)
- (101) CONRADS, H., D. WINTERHOFF und U. STROTMANN
Klin. Mbl. Augenheilk. 184, 233 (1984)
- (102) DOLDER, R.
Pharm. Acta Helv. 27, 235 (1952)
- (103) HOEVENARS, P.C.M.
Pharm. Weekblad 100, 1151 (1965)
- (104) WOLLMANN, H., R. GRÜNERT und G. RUDOLPH
Pharmazie 33, 44 (1978)
- (105) SPAETH, G.L.
Arch. Ophthal. S. 77, 355 (1967)
- (106) CORWIN, M.E. und W.H. SPENCER
Arch. Ophthal. S. 69, 317 (1963)
- (107) KREJCI, L. und R. HARRISON
Arch. Ophthal. S. 81, 836 (1969)
- (108) BÜCHI, J.
Pharm. Acta Helv. 42, 673 (1967)
- (109) SCHROETER, L.C. und T. HIGUCHI
J. Amer. Pharm. Assoc. 47, 426 (1958)
- (110) VAUGHAN, D., R. SHAFFER und S. RIEGELMANN
Arch. Ophthalmol. 66, 108 (1961)

- (111) RIEGELMANN, S. und E.Z. FISCHER
J. Pharm. Sci. 206, 210 (1962)
- (112) RAETHER, G. und H. WOLLMANN
Pharmazie 34, 667 (1979)
- (113) DAS 1211357, 24. Febr. 1966
- (114) AUTERHOFF, H. und C. EINBERGER
Dtsch. Apoth. Ztg. 113, 1817 (1973)
- (115) HAJRATWALA, B.R.
J. Pharm. Sci. 64, 45 (1975)
- (116) TROLLE-LASSEN, C.
Pharm. Weekblad 93, 148 (1958)
- (117) LIST, P.H. und U. KRAUSE
Pharm. Ztg. 124, 946 (1979)
- (118) ENGELHARDT, H.
Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977
- (119) THOMA, K. und M. STRUVE
Pharm. Acta Helv. 61, 2 (1986)

L E B E N S L A U F

Otto Ernst Schubert geb. 22.01.1952 in München/Bayern
als Sohn des Apothekers Rudolf
Schubert und seiner Ehefrau Rose-
marie geb. Iacob

Schulbildung: September 1958 mit Januar 1959
Volksschule Mallersdorf/Ndb.
Februar 1959 mit Juli 1961 Städt.
Volksschule Regensburg-Steinweg
September 1961 mit Juli 1962 Vor-
schule der Regensburger Domspatzen
in Etterzhausen
September 1962 mit Juli 1971 Musik-
gymnasium der Regensburger Dom-
spatzen, humanistischer Zweig mit
weiterem Hauptfach Musik
Reifeprüfung: Juni 1971

Wehrdienst: 01. April 1974 bis 31. März 1976

Berufsausbildung:

Praktische Ausbildung: September 1971 - August 1973 in der
Wolfgang-Apotheke in Regensburg
Pharmazeutische Vorprüfung am
06. Juli 1973

Studium der Pharmazie: SS 1976 - WS 1976/77 an der Philo-
sophisch-Theologischen Hochschule
Passau;
SS 1977 - SS 1979 an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Approbation als Apotheker: 06. Dezember 1979

Wissenschaftliche Arbeit:

nach Abschluß der Aufbauarbeiten
des neu errichteten Lehrstuhls für
Pharmazeutische Technologie ab
1982 bis April 1986 unter Anlei-
tungs von Herrn Prof. Dr. K. Thoma

Berufliche Tätigkeit:

Mai 1980 - August 1981 als teil-
zeitbeschäftigte wissenschaftliche
Hilfskraft, September 1981 - Oktober
1983 als vollbeschäftigte wissen-
schaftliche Hilfskraft und seit
November 1983 als Akad. Rat a.Z.
am Lehrstuhl für Pharmazeutische
Technologie der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

